



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
Facultad de Medicina
Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia

MODULACIÓN DE LA TRANSMISIÓN SINÁPTICA
INDUCIDA POR IGF-I EN NEURONAS PIRAMIDALES
DE LA CORTEZA INFRALÍMBICA Y DE BARRILES

Tesis doctoral
José Antonio Noriega Prieto

Dirigida por el Doctor
David Fernández de Sevilla García
Madrid, 2019



Dr. David Fernández de Sevilla García, Profesor Contratado Doctor del Departamento de Anatomía Histología y Neurociencia de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

HACE CONSTAR:

Que D. José Antonio Noriega Prieto ha realizado bajo mi dirección los trabajos de investigación destinados a la obtención del grado de Doctor en el Departamento de Anatomía Histología y Neurociencia de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, cuyos resultados están recogidos en la presente memoria de Tesis Doctoral titulada “Modulación de la transmisión sináptica inducida por IGF-I en neuronas piramidales de la corteza infralímbica y de barriles”. Considero que dichos trabajos han sido ejecutados satisfactoriamente y una vez revisados manifiesto mi conformidad con la presentación de esta tesis para ser juzgada.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, lo firmo en Madrid a 4 de septiembre de 2019.

Dr. David Fernández de Sevilla García

Profesor Contratado Doctor de la UAM

FUENTES DE FINANCIACION

Este estudio ha sido financiado con los siguientes proyectos:

Ministerio de Economía y Competitividad, España (MINECO; BFU2013-43668-P y BFU2016-80802-P AEI/FEDER, UE).

COMITÉ DE ETICA

Los procedimientos llevados a cabo en esta tesis doctoral han sido aprobados por el director general de medio ambiente de la Comunidad de Madrid y por el comité de ética de la Universidad Autónoma de Madrid, contando con un informe favorable del El Órgano encargado del Bienestar animal (OEBA) del Gabinete Veterinario de la Universidad Autónoma de Madrid.

RESUMEN

IGF-I es un péptido con funciones tróficas bien estudiadas. Sin embargo, su papel como neuromodulador es objeto de debate. Algunas investigaciones han estudiado la acción del IGF-I sobre la transmisión sináptica tanto excitadora como inhibidora y sobre la excitabilidad neuronal. De hecho, IGF-I afecta a la extensión de los campos receptivos, y reduce el umbral de generación de potenciales de acción en respuesta a estímulos en la corteza somatosensorial, además de aumentar de la actividad del electrocorticograma (ECG) en esta corteza. Se ha demostrado que, en la modulación de la transmisión sináptica, los astrocitos juegan un papel muy importante. Asimismo, estos pueden sintetizar IGF-I y presentan en su membrana plasmática receptores de IGF-I (IGF-IR). Aquí se muestra que el IGF-I incrementa la excitabilidad e induce una potenciación a corto plazo (STP) de las corrientes postsinápticas excitadoras (EPSC) en neuronas piramidales de capa 2/3 de la corteza de barriles del ratón. Sin embargo, IGF-I genera una modulación dual del EPSC ya que se observa una depresión a largo plazo (LTD) presináptica del EPSC cuando la acción del IGF-I es en ausencia de potenciales de acción o de incrementos de calcio citosólico postsináptico. Adicionalmente, también induce una LTD de las corrientes postsinápticas inhibitoras (IPSC). Aunque la potenciación del EPSC mediada por IGF-I requiere la activación de los receptores de adenosina A_1 y A_{2A} y los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR) del grupo I, solo la activación de los A_{2A} es necesaria para la depresión del EPSC y del IPSC. En adición, tanto la modulación dual del EPSC como del IPSC son dependientes de aumentos de calcio citosólico astrocitario. Por tanto, IGF-I podría tener una funcionalidad en procesos de memoria asociativa tanto in vitro como in vivo al inducir metaplasticidad favoreciendo la plasticidad sináptica inducida por protocolos de *Spike Timing dependent plasticity* (STDP).

Por otro lado, los niveles de IGF-I se han relacionado con procesos emocionales, estando disminuidos en la corteza prefrontal medial (mPFC) de ratas con ansiedad asociada a diabetes mellitus. Esta corteza es fundamental en la memoria del miedo condicionado, habiéndose demostrado que los aumentos de excitabilidad neuronal y eficacia sináptica en neuronas piramidales de capa 5 facilitan la memoria de extinción. En esta tesis denostamos que IGF-I tiene la capacidad de disminuir las corrientes de potasio dependientes de calcio que median la posthiperpolarización de cinética lenta (sl_{AHP}), lo que produce un aumento de la excitabilidad. Además, IGF-I deprime a largo plazo tanto las corrientes sinápticas excitadoras como la inhibitoras, traduciéndose en una potenciación a largo plazo (LTP) de los potenciales

postsinápticos. A nivel comportamental, estos efectos moduladores de IGF-I en la actividad de la mPFC resulta en una facilitación de la extinción del miedo condicionado.

ABSTRACT

IGF-I is a peptide with well-studied trophic functions. However, its role as a neuromodulator is a matter of debate. Some research has studied the action of IGF-I on both excitatory and inhibitory synaptic transmission and on neuronal excitability. In fact, IGF-I affects the extension of the receptive fields, and reduces the threshold of generation of action potentials in response to stimuli in the somatosensory cortex, in addition to increase the activity of the electrocorticogram (ECG) in this cortex. Astrocytes have been shown to play a very important role in the modulation of synaptic transmission. They can also synthesize IGF-I and have IGF-I receptors (IGF-IR) on their plasma membrane. Here it is shown that IGF-I increases excitability and induces a short-term potentiation (STP) of excitatory postsynaptic currents (EPSCs) in layer 2/3 pyramidal neurons of the mouse barrel cortex. However, IGF-I generates a dual modulation of the EPSCs since presynaptic long-term depression (LTD) of the EPSCs is observed when the action of IGF-I is in the absence of action potentials or increases in postsynaptic cytosolic calcium. Additionally, it also induces a LTD of postsynaptic inhibitory currents (IPSCs). Although the potentiation of the EPSCs mediated by IGF-I requires the activation of the A_1 and A_{2A} adenosine receptors and the group I metabotropic glutamate (mGluR) receptors, only the activation of the A_{2A} is necessary for the depression of the EPSCs and IPSCs. In addition, both the dual modulation of EPSCs and IPSCs are dependent on increases in astrocyte cytosolic calcium. Therefore, IGF-I could have a functionality in associative memory processes both in vitro and in vivo by inducing metaplasticity favoring synaptic plasticity induced by Spike Timing dependent plasticity (STDP) protocols.

On the other hand, IGF-I levels have been related to emotional processes, being decreased in the medial prefrontal cortex (mPFC) of rats with anxiety associated with diabetes mellitus. This cortex is essential in the memory of fear conditioned, showing that increases in neuronal excitability and synaptic efficacy in layer 5 pyramidal neurons facilitate the extinction memory. In this thesis, we demonstrate that IGF-I has the ability to decrease calcium-dependent potassium currents that mediate slow kinetic posthyperpolarization (sl_{AHP}), resulting in increased excitability. In addition, IGF-I depresses both excitatory and inhibitory synaptic currents in long term, resulting in long-term potentiation (LTP) of postsynaptic potentials. At

the behavioral level, these modulating effects of IGF-I on the activity of the mPFC result in a facilitation of the extinction of fear conditioned.

ABREVIATURAS

μl: Microlitro.

μM: Micromolar.

MΩ: Megaohmio.

A₁/A_{2A}: Receptores para adenosina tipo 1 y tipo 2A.

ACC: Del inglés *anterior cingulate cortex*. Corteza cingular anterior.

AMPA: Ácido (RS)-2-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico.

ATP: Adenosina 5'-trifosfato.

BLA: Complejo basolateral de la amígdala

CAMKII: Proteína quinasa II dependiente de Ca²⁺/Calmodulina.

CB1R: Receptores para endocannabinoide tipo 1.

CC: Del inglés *current-clamp*. Fijación de corriente.

CNQX: 6-ciano-7-nitroquinoxalin-2,3-diona.

D-AP5: D-(-)-2-Amino-5-phosphonopentanoic acid

dB: Decibelio.

eCB: Endocannabinoide.

ECG: Electrocardiograma.

EPSC: Del inglés *excitatory postsynaptic current*. Corriente postsináptica excitadora.

GΩ: Gigaohmio.

GABA: Ácido γ-amino-n-Butírico.

GH: Del inglés *growth hormone*. Hormona del crecimiento.

GPCR: Del inglés *G-protein-coupled receptor*. Receptores acoplados a proteínas G.

Hz: Hercio.

IGF-I: Del inglés *insulin-like growth factor I*. Factor de crecimiento insulínico tipo I.

IGF-IR: Del inglés *insulin-like growth factor I receptor*. Receptor del factor de crecimiento insulínico tipo I.

IGF-II: Del inglés *insulin-like growth factor II*. Factor de crecimiento insulínico tipo II.

IGFBP: Del inglés *Insulin-like growth factor-binding protein*. Proteína de unión al factor de crecimiento tipo insulínico.

IL: Corteza infralímbica.

IP3: Inositol 1,4,5-trifosfato.

IPSC: Del inglés *inhibitory postsynaptic current*. Corriente postsináptica inhibitoria.

IRS: Del inglés *insulin receptor substrate*. Sustrato del receptor de insulina.

KHz: Kilohercio

LCA: Líquido cefalorraquídeo artificial.

LFS: Del inglés *low-frequency stimulation*. Estimulación de baja frecuencia.

LTD: Del inglés *long-term depression*. Depresión a largo plazo.

LTP: Del inglés *long-term potentiation*. Potenciación a largo plazo.

mGluR: Del inglés *metabotropic glutamate receptor*. Receptor metabotrópico de glutamato.

ml_{AHP}: Del inglés *medium afterhyperpolarization current*. Corriente de posthiperpolarización de cinética media.

mM: Milimolar.

mPFC: Del inglés *medial prefrontal cortex*. Corteza prefrontal medial.

ms: Milisegundo.

mV: Milivoltio.

nA: Nanoamperio.

NMDA: N-metil-D-aspartato.

NO: Del inglés *nitric oxide*. Óxido nítrico.

pA: picoamperio.

PA: Potencial de acción.

PB: Del inglés *phosphate buffer*. Tampón fosfato.

PFA: Paraformaldehído.

PiTX: Picrotoxina.

PKC: Del inglés *protein kinase C*. Proteína quinasa C.

PL: Corteza prelímbica.

POm: Del inglés *posterior medial nucleus*. Núcleo posterior medial.

PPD: Del inglés *paired-pulse depression*. Depresión por pulsos apareados.

PPF: Del inglés *paired-pulse facilitation*. Facilitación por pulsos apareados.

PPR: Del inglés *paired-pulse ratio*. Ratio de pulsos pareados.

Pr: Del inglés *probability of release*. Probabilidad de liberación.

PSC: Del inglés *post-synaptic current*. Corriente postsináptica.

PSD: Del inglés *post-synaptic density*. Densidad postsináptica.

PSP: Del inglés *post-synaptic potential*. Potencial postsináptica.

PTP: Del inglés *post-tetanic potentiation*. Potenciación Post-tetánica.

Rm: Resistencia de membrana.

sl_{AHP}: Del inglés *slow afterhyperpolarization current*. Corriente de posthiperpolarización de cinética lenta.

SNC: Del inglés *central nervous system*. Sistema nervioso central.

SNAP-SNARE: Del inglés. **SNAP** *Soluble Attachment Protein*, **Receptor**. Receptores de proteínas de fijación soluble.

STDP: Del inglés *Spike-timing-dependent plasticity*. Plasticidad dependiente del tiempo de disparo.

STD: Del inglés *Short-term depression*. Depresión a corto plazo.

STP: Del inglés *Short-term potentiation*. Potenciación a corto plazo.

TBS: Del inglés *theta burst stimulation*. Estimulación en ráfaga theta.

VC: Del inglés *voltage-clamp*. Fijación de voltaje.

VPM: Del inglés *Ventral posteromedial nucleus*. Núcleo ventral posteromedial

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1. Plasticidad sináptica.....	2
1.1. Tipos de plasticidad sináptica.....	2
1.1.1 Plasticidad sináptica a corto plazo.....	2
1.1.2. Plasticidad sináptica a largo plazo	4
1.1.3. Plasticidad intrínseca	6
1.1.4. Plasticidad homeostática.....	7
1.2. El astrocito como elemento integrador en la sinapsis.....	9
1.2.1. Sinapsis tripartita.....	9
1.2.2. Comunicación astrocitaria: Las ondas de calcio.	10
1.2.3. El astrocito en la plasticidad sináptica.....	11
2. Corteza de Barriles	13
3. Miedo condicionado.....	15
3.1. Adquisición del miedo condicionado.....	15
3.2. Extinción del miedo condicionado.....	17
3.2.1. Corteza prefrontal medial: Corteza Infralímbica	20
4. Factor de crecimiento insulínico tipo-I.....	22
4.1. Fisiología del IGF-I.....	22
4.2. Receptor de IGF-I	23
4.4. Acciones del IGF-I.....	26
4.4.1. Plasticidad sináptica e IGF-I	27
4.4.2. Astrocitos e IGF-I	28
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	31
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
1. Declaración ética	36
2. Animales de experimentación	36
3. Obtención del encéfalo y preparación de rodajas.....	36

4. Identificación de capas y tipos neuronales	37
5. Registros electrofisiológicos.....	38
5.1. Técnica de patch clamp ex vivo	38
5.3. Estimulación sináptica.....	39
5.4.1. Corrientes lentas de K ⁺ activadas por Ca ²⁺ (sI _{AHP})	40
5.4.2. Excitabilidad neuronal y resistencia de membrana (R _m)	41
5.4.3. Plasticidad dependiente del tiempo de disparo de la espiga (STDP, spike timing-dependent plasticity).....	41
5.4.4. Estimulación sensorial	41
6. Procedimientos quirúrgicos.....	42
7. Procedimientos comportamentales.....	44
8. Perfusión transcárdica y tratamiento histológico	45
9. Monitorización de los aumentos de Ca²⁺ astrocitarios.....	46
10. Fármacos y reactivos utilizados.....	47
11. Análisis estadístico de los datos	48
IV. RESULTADOS	51
1. IGF-I induce aumentos en la resistencia de membrana y en la excitabilidad neuronal en capa 2/3.....	52
2. IGF-I modula la transmisión sináptica.	54
3. La STP de las EPSC inducida por IGF-I se convierte en una LTD al prevenir los aumentos de calcio citosólico en la neurona postsináptica.	56
4. La STP de las EPSC no se debe a cambios en la probabilidad de liberación de glutamato.....	59
5. La plasticidad de las EPSC inducida por IGF-I requiere la actividad astrocitaria.....	62
6. IGF-I induce una LTD de la transmisión sináptica inhibitoria.....	65
7. La LTD de las IPSC inducida por IGF-I requiere la actividad astrocitaria	67
8. IGF-I induce una LTP de la transmisión sináptica	69

9. IGF-I Induce LTP en capa 2/3 de la corteza de barriles in vivo.....	71
10. IGF-I induce metaplasticidad.....	73
11. IGF-I facilita la adquisición y el recuerdo de la memoria de extinción del miedo condicionado	76
12. IGF-I aumenta la excitabilidad y la Rm, e inhibe la sl_{AHP} en corteza infralímbica	78
14. IGF-I induce plasticidad de la transmisión sináptica excitadora e inhibidora en la capa 5 de la corteza infralímbica.....	81
15. IGF-I induce una LTP de los PSP	85
V. DISCUSIÓN	87
1. Modulación por IGF-I en la corteza de Barriles	88
1.1 Modulación de las propiedades intrínsecas y la excitabilidad	88
1.2 Modulación de la transmisión sináptica excitadora	89
1.3 Modulación de la transmisión sináptica inhibidora	91
1.4 Metaplasticidad inducida por IGF-I.....	92
1.5 Efectos moduladores del IGF-I in vivo.....	93
1.6 Modelo de las acciones de IGF-I en capa 2/3 de la corteza de barriles.	93
2. Modulación de la actividad de la corteza de infralímbica y su relación con la modulación del miedo condicionado por IGF-I.....	96
2.1. IGF-I facilita la memoria de extinción del miedo condicionado	97
2.2. IGF-I aumenta la excitabilidad y reduce las sl_{AHP}	98
2.3. IGF-I induce LTD de las EPSC e IPSC resultando en una LTP de los PSP	98
VI. CONCLUSIONES	102
VII. BIBLIOGRAFÍA	105

I. INTRODUCCIÓN

1. Plasticidad sináptica

Una de las características más increíbles y fascinantes del cerebro es su plasticidad. Se trata de la capacidad de generar cambios en su estructura y/o funciones dependientes de la experiencia (Glazewski et al. 1996, science; Glazewski et al. 1996, J. neurophysiology; D. H. O'Connor et al. 2010). A nivel celular, se habla de plasticidad sináptica como una característica de las neuronas de cambiar la eficacia de sus sinapsis ya formadas y/o de formar nuevas conexiones.

La plasticidad sináptica juega un papel imprescindible para la creación de las redes neuronales durante el desarrollo del sistema nervioso. De hecho, se sabe que fallos a estos niveles producen enfermedades psiquiátricas, poniendo de manifiesto que la homeostasis de la red neuronal es de vital importancia. Los tipos de plasticidad y sus mecanismos han sido estudiados tanto a nivel de circuito como a nivel celular y molecular (Citri and Malenka, 2008).

1.1. Tipos de plasticidad sináptica

La plasticidad se ha clasificado en función del tiempo de duración en plasticidad a corto plazo (de milisegundos a minutos) y la plasticidad a largo plazo (de horas a días). Además, se especifica si aumenta la eficacia en la transmisión sináptica, potenciación (STP del inglés *short-term potentiation* o LTP del inglés *long-term potentiation*), o si disminuye la eficacia, depresión (STD del inglés *short-term depression* o LTD del inglés *long-term depression*) (Citri and Malenka, 2008).

1.1.1 Plasticidad sináptica a corto plazo

La plasticidad sináptica a corto plazo tiene una acción importante en cambios adaptativos a estímulos sensoriales, cambios transitorios en estados comportamentales y formas de memoria a corto plazo. La mayor parte de la plasticidad sináptica a corto plazo está desencadenada por acumulación de calcio presináptico tras patrones de actividad de corta duración. Este aumento de calcio presináptico produce cambios en la maquinaria bioquímica de exocitosis de vesículas sinápticas que contienen glutamato, cambiando la probabilidad de liberación (Pr del inglés *probability of release*) del neurotransmisor (Citri and Malenka, 2008).

Una de las formas de plasticidad sináptica a corto plazo mejor estudiada es la facilitación y la depresión inducidas por estímulos pareados. En estas formas de plasticidad se producen cambios en Pr cuando dos estímulos idénticos se producen en un corto periodo de tiempo (menor a 500 ms) generándose dos respuestas pareadas. En sinapsis con baja Pr, durante el primer estímulo, la llegada del potencial de acción al terminal presináptico induce la acumulación de calcio, que, sumado a la entrada de calcio inducida por el segundo potencial de acción, libera más neurotransmisor produciéndose una segunda respuesta que es mayor que la primera. Este fenómeno de potenciación a corto plazo recibe el nombre de facilitación por pulsos pareados (PPF del inglés *paired-pulse facilitation*) (Katz and Miledi, 1968; Debanne et al., 1996). También puede ocurrir lo contrario, siendo la respuesta al segundo estímulo menor que la primera respuesta y entonces a esta depresión a corto plazo se le llama depresión por pulsos pareados (PPD del inglés *paired-pulse depression*). En el caso de la PPD, este fenómeno ocurre fundamentalmente en sinapsis con alta Pr que hace que durante el primer estímulo se libere la mayor parte de neurotransmisor, explicando que la segunda respuesta sea menor debido a que esta depleción de las vesículas hace que no existan vesículas disponibles para ser liberadas (Betz, 1970; Debanne et al., 1996). Ambos fenómenos son dependientes del estado de activación previo de esas sinapsis. Pero, además, mecanismos postsinápticos pueden participar en la desensibilización de los receptores, convirtiendo a las neuronas menos sensibles al agonista (Zucker and Regehr, 2002).

Los estímulos de alta frecuencia (>50Hz) y prolongada duración (200 ms a 5 s) pueden inducir dos formas de plasticidad a corto plazo, la aumentación que tiene una duración de 5-10 segundos, y la potenciación post-tetánica (PTP del inglés *post-tetanic potentiation*) con una duración de decenas de segundos a minutos. Ambos fenómenos están definidos en cuanto al número y duración de estímulos necesarios para ser desencadenados, y son producidos por un aumento de Pr en el terminal presináptico tras la llegada del primer potencial de acción. Este calcio residual se une al flujo de calcio de los siguientes potenciales de acción produciendo este aumento en la liberación de neurotransmisor (Magleby and Zengel, 1976; Nussinovitch and

Rahamimoff, 1988). Sin embargo, en algunas sinapsis la estimulación repetitiva produce depresión a corto plazo en lugar de potenciación. Generalmente es un proceso que acontece en sinapsis con alta Pr debido a la depleción de las vesículas que contienen neurotransmisor presinápticamente (Betz, 1970).

1.1.2. Plasticidad sináptica a largo plazo

La información se almacena en nuestro cerebro en forma de recuerdos, sensaciones o sentimientos que pueden mantenerse durante largos periodos de tiempo (superiores a una hora). El Premio Nobel Santiago Ramón y Cajal (Jones, 1994) y años después Donald Hebb (Hebb, 1949a) propusieron que los aumentos de actividad producirían cambios de larga duración en la eficacia de las sinapsis que serían a largo plazo, siendo los responsables de los procesos de memoria y aprendizaje. Se proponía que la memoria asociativa es formada cuando la actividad presináptica y postsináptica ocurría en una ventana temporal determinada (en torno a los 100 ms). Además, esta idea subyace como sustrato biológico sobre la teoría conductual propuesta por Iván Pávlov en 1927 (Pavlov, 2010) sobre el fenómeno de condicionamiento clásico, que es una forma de aprendizaje y memoria basada en la asociación de estímulos.

En los años 70, Bliss y Lomo sustentaron esta teoría, experimentalmente. Pudieron comprobar que tras la activación repetida de las sinapsis excitadoras del hipocampo, se producía una potenciación que podía durar horas e incluso días (Bliss and Lømo, 1973). Las formas de plasticidad sináptica a largo plazo más estudiadas y descritas son la LTP y la LTD dependientes de la activación de los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDAR). Además, existen otros tipos de plasticidades a largo plazo independientes de los NMDAR y otras formas de plasticidad como es la plasticidad homeostática.

La plasticidad dependiente del tiempo de disparo (STDP del inglés *spike-timing-dependent plasticity*) es una de las formas más fisiológicas de desencadenar plasticidad sináptica a largo plazo. Tanto la LTP como la LTD inducidas por STDP son dependientes de la activación de los NMDAR y debidas a cambios en los niveles de calcio postsináptico (Andrade-Talavera et al., 2016; Banerjee et al., 2009). Se ha demostrado

que la coincidencia de la actividad pre- seguida de actividad postsináptica en cortos periodos de tiempo (≤ 50 milisegundos) genera grandes aumentos de calcio que conducen a la LTP. Estos aumentos de calcio activan a proteínas quinasas como Proteína quinasa II dependiente de Ca^{2+} /Calmodulina (CAMKII), produciendo en último término el aumento de la conductancia unitaria del receptor de ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico (AMPA) y un aumento de la exocitosis de endosomas que contienen el AMPAR, así como su movilización lateral a la zona de densidad postsináptica (PSD, del inglés *post-synaptic density*). Posteriormente, se produce un aumento en el tamaño de la PSD de las espinas dendríticas. Sin embargo, la coincidencia de la actividad postsináptica seguida de actividad presináptica en cortos periodos de tiempo (≤ 50 milisegundos) genera incrementos de calcio moderados que producen la LTD por activación preferencial de las fosfatasas, desencadenando la movilización lateral de los AMPAR y su posterior internalización. Este tráfico de receptores es el paso crítico para la modificación estructural de la PSD. Estas modificaciones en las estructuras dendríticas son la base por la cual los cambios bidireccionales en la eficacia sináptica se mantienen a largo plazo (Bi and Poo, 2001; Nevian and Sakmann, 2006). Donald Hebb postuló que la LTP se define por tener características diferenciadas como son la cooperatividad, la asociatividad y la especificidad (Hebb, 1949b). La primera hace referencia a que se requiere la activación de varias sinapsis para alcanzar el umbral de generación de la LTP, la segunda se refiere a que una respuesta débil (generada por la activación de pocas sinapsis) puede potenciarse si su activación coincide junto con una respuesta fuerte (generada por la activación de muchas sinapsis) y la tercera implica que el aumento de la eficacia sináptica solo se da en las sinapsis activadas (Bi and Poo, 2001).

El orden de la coincidencia temporal de actividad pre y postsináptica alrededor de los 40 ms define qué tipo de plasticidad a largo plazo se va a producir. De tal manera que si la neurona postsináptica dispara hasta 20 ms después de la activación presináptica (activación pre-post), se produce una LTP. Sin embargo, si ocurre al contrario en la misma ventana temporal (activación post-pre), se desencadena una LTD. De modo que la ventana temporal de modulación de la transmisión sináptica varía

en unos pocos milisegundos (Bi and Poo, 2001). A pesar de que este tipo de inducción de la plasticidad ocurre en diversas áreas cerebrales, la ventana temporal y el tipo de plasticidad inducido por el orden de activación pre-postsináptico puede ser específico del área. Así se sabe que en la corteza de barriles la ventana temporal en las sinapsis de las neuronas piramidales de la capa 5 puede aumentar hasta 100 ms. Sin embargo, las sinapsis entre neuronas estrelladas de la capa 4 muestran LTD independientemente del orden de la coincidencia temporal de actividad pre y postsináptica, siendo la ventana temporal de ≈ 25 ms (Markram et al., 1997; Egger et al., 1999).

1.1.3. Plasticidad intrínseca

Cuando se habla de plasticidad, no necesariamente se hace referencia a cambios en la eficacia sináptica, sino que además existen modificaciones de las propiedades intrínsecas de las neuronas tanto en sus propiedades activas como en las pasivas. Estas propiedades son importantes ya que definen la respuesta generada por las neuronas ante una determinada aferencia de información. Por tanto, las propiedades intrínsecas de las neuronas definen cómo la neurona integra la información que recibe y la transmite, y por tanto son claves en su funcionalidad.

Para que se produzca la propagación retrógrada de los potenciales de acción y pueda darse el fenómeno de STDP como mecanismo inductor de plasticidad sináptica a largo plazo, es necesario una funcionalidad óptima de los canales dependientes de voltaje presentes en el árbol dendrítico. Las neuronas tienen una distribución específica de estos canales que les permite integrar la información. De tal manera que la estimulación sináptica provoca espigas de calcio dendríticas postsinápticas asociadas a la activación de los NMDAR y los canales de calcio dependientes de voltaje. Su mayor o menor propagación dependerá del número de canales activados y del calcio liberado desde los reservorios intracelulares por los segundos mensajeros. Además, las dendritas también poseen canales de sodio y potasio, cuya función más importante probablemente sea la de dar soporte al potencial de acción propagado retrógradamente. Por consiguiente, las propiedades intrínsecas y su plasticidad son de vital importancia para la integración de la información (Spruston, 2008).

1.1.4. Plasticidad homeostática

Todo sistema organizado necesita mecanismos que lo mantengan en unos rangos de actividad que le permitan ser operativo. Así el cerebro posee mecanismos que lo mantienen en esos rangos de actividad que le permiten alcanzar su función. Uno de estos mecanismos es el de la plasticidad homeostática que permite dar estabilidad a la red neuronal. Existen dos formas de plasticidad homeostática, el escalado sináptico y la metaplasticidad.

El escalado sináptico es uno de los mecanismos para mantener la red neuronal en un rango dinámico de actividad. De tal manera que, mediante un sistema de retroalimentación negativa, es capaz de modificar el número de AMPAR dando a la neurona postsináptica un control de la eficacia sináptica de todas las conexiones, modificando la probabilidad del glutamato de interaccionar con los AMPAR postsinápticos (Turrigiano, 2008). Aunque inicialmente se pudo comprobar el efecto del escalado sináptico en corrientes postsinápticas dependientes de los AMPAR, más tarde también se han estudiado las corrientes dependientes de los NMDAR en este tipo de homeostasis, concluyendo un efecto similar al observado en los AMPAR, manteniéndose de hecho la ratio AMPAR/NMDAR proporcional en las células que expresaban ambos receptores (Carmignoto and Vicini, 1992; Watt et al., 2000; Desai et al., 2002).

Otro mecanismo utilizado en la homeostasis del sistema nervioso central (SNC) es la metaplasticidad. El nombre se le otorgó debido a que se trataba de la plasticidad de la plasticidad sináptica según acuñaron Wickliffe C. Abraham y Mark F. Bear en los años 90. Se trata de la habilidad de las neuronas de modificar el umbral de generación de la LTP o LTD (Abraham and Bear, 1996). Se expresa como un cambio en la capacidad de producir plasticidad sináptica en función del estado previo de las neuronas. Diferentes mecanismos se han planteado como mediadores de procesos metaplásticos. Uno de estos se basa en que la activación de los NMDAR además de ser clave para la generación de LTP puede dificultar su inducción a través del aumento del umbral de generación de esta plasticidad. Por tanto, el umbral para inducir LTP puede ser más alto en las sinapsis activas, evitando posibles daños celulares por

excitotoxicidad (Huang et al., 1992). Por otro lado, incluso cuando las sinapsis son sometidas a estímulos repetitivos de alta frecuencia que desencadenan LTP, puede verse impedida esta plasticidad y su persistencia en función de la actividad previa a través de un mecanismo dependiente de NMDAR, receptores de adenosina y fosfatasas (Woo and Nguyen, 2002). Pero no solo se ha vinculado el NMDAR en procesos de metaplasticidad relacionados con la potenciación, sino que también se ha comprobado cómo este receptor está implicado en la modulación del umbral de la LTD asociativa inducida por una estimulación a baja frecuencia (LFS del inglés *low-frequency stimulation*) (Christie and Abraham, 1992). De este modo Mockett y cols. demuestran que antagonizando los NMDAR se ve reducida la segunda LTD en el *stratum radiatum* de CA1 en el hipocampo (Mockett et al., 2002).

Pero el NMDAR no es el único receptor relacionado con la metaplasticidad, sino que los receptores metabotrópicos del glutamato (mGluR del inglés *metabotropic glutamate receptors*) también juegan un papel muy importante. Este tipo de receptores asociados a proteína G son responsables de la disminución de las corrientes de potasio dependientes de calcio como son las corrientes que median la posthiperpolarización lenta (sl_{AHP} del inglés *slow afterhyperpolarization current*). En consecuencia se ve incrementada la excitabilidad de las neuronas, lo que conlleva una facilitación de la despolarización postsináptica y una mayor LTP generada por una estimulación en ráfaga theta (TBS del inglés *theta burst stimulation*) (Cohen et al., 1999). Se han descrito diferentes modos de desencadenar una plasticidad intrínseca a través de la modulación de canales dependientes de voltaje de sodio, calcio y potasio. Así, hay estudios que revelan que la sl_{AHP} regula el umbral de inducción de la LTP (Sah and Bekkers, 1996), siendo estas corrientes reguladas por diferentes neurotransmisores como el glutamato, noradrenalina, acetilcolina o la serotonina. De modo que esta corriente es clave para la inducción de ciertas formas de metaplasticidad.

Por tanto, los cambios no solo se producen a nivel sináptico sino también a nivel de las propiedades intrínsecas. Como se acaba de exponer en apartados anteriores, estas propiedades que confieren a la neurona su funcionalidad son perfectas candidatas

para la metaplasticidad, cuya modulación regula la expresión de diferentes tipos de plasticidades como la LTP o la LTD.

1.2. El astrocito como elemento integrador en la sinapsis

Los astrocitos son células que forman parte estructural y funcional de algunas sinapsis. Son células pertenecientes a la neuroglia, cuya descripción primera fue documentada en 1846 por Virchow, atribuyéndole la función de aglutinante. De ahí su nombre *neuron*, nervio, *glía*, pegamento. “Que pega o une elementos nerviosos”. Posteriormente, la neuroglia se dividió en células de Schwann, oligodendrocitos, microglía y astrocitos. Años después, Santiago Ramón y Cajal en desacuerdo con este único papel del astrocito, postuló su papel activo en la neurofisiología. Pero fue el avance en las técnicas y herramientas que tuvo lugar en los años 80 del siglo XX, lo que permitió estudiar sus funciones en profundidad, comprobándose que jugaban un papel más complejo más allá del soporte trófico que hasta el momento se le había atribuido (Walz, 1989).

1.2.1. Sinapsis tripartita

Los astrocitos se encuentran a lo largo de todo el SNC. Están formados por un soma y numerosas prolongaciones denominadas “procesos”, que les sirven para estar íntimamente ligados a los elementos neuronales. Desde un principio, se les dio un protagonismo único a los elementos neuronales, de tal manera que la sinapsis la formaban el elemento presináptico, el cual a través de la llegada del potencial de acción libera los neurotransmisores para interactuar con sus correspondientes receptores postsinápticos presentes en el elemento postsináptico. La activación de los receptores postsinápticos creaba una respuesta eléctrica y se producía, de esta manera, la transmisión de la información. Sin embargo, a finales de los años 90 se introdujo un concepto nuevo que dotaba a los astrocitos de un papel activo e integrador en la sinapsis clásica. Este término fue la Sinapsis Tripartita (Araque et al., 1999). Tal concepto otorgaría a la sinapsis un nuevo componente, por lo que estaría formada por el elemento presináptico, el postsináptico y los astrocitos adyacentes. Los procesos astrocitarios están rodeando la zona activa de la sinapsis, lo que les permite

modular desde la excitabilidad neuronal hasta la transmisión sináptica, creando una comunicación directa astrocito-neurona.

1.2.2. Comunicación astrocitaria: Las ondas de calcio.

El calcio es fundamental en la transmisión sináptica. Tal es así que la liberación de neurotransmisor es dependiente de la concentración de este ion. De igual modo, el calcio es de vital importancia en el funcionamiento de los astrocitos, ya que produce la fusión de vesículas a través del complejo SNAP-SNARE (del inglés ***SNAP Soluble Attachment Protein, Receptor***, receptores de proteínas de fijación soluble) con la membrana plasmática para la posterior liberación de los gliotransmisores. Además, a través de la difusión de este ion entre los astrocitos por las *gap-junction* (del inglés uniones estrechas) da lugar a la comunicación astrocitaria. Las elevaciones de calcio astrocitarias tienen propiedades espacio-temporales específicas en respuesta a distintos estímulos. La activación de receptores acoplados a proteínas G (GPCR del inglés *G-protein-coupled receptors*) produce la síntesis de inositol 1,4,5-trisfosfato (IP₃) que se une a su receptor en el retículo endoplasmático del astrocito, lo que produce la liberación del calcio desde este orgánulo al citosol. Los aumentos de calcio en los microdominios astrocitarios debidos a la actividad neuronal espontánea se asocian a la liberación de gliotransmisor. Estos fenómenos en los que el calcio no se expande de un dominio a otro se han denominado “eventos locales” (Di Castro et al., 2011). Sin embargo, en determinadas ocasiones estos incrementos en los niveles de calcio pueden pasar de un microdominio a otros que se encuentran en diferentes procesos, e incluso a la célula completa. Tales aumentos son fenómenos activos debidos a la actividad sináptica dependiente de potenciales de acción (Di Castro et al., 2011).

Cuando el aumento de las concentraciones intracelulares de calcio se transmite de un astrocito a los adyacentes se produce lo que se conoce como “ondas de calcio”. De tal manera que el aumento de calcio en un astrocito puede viajar a través de la red astrocitaria y producir una respuesta en sinapsis lejanas (Navarrete and Araque, 2010). Un amplio número de estudios han comprobado que estas ondas de calcio producen la liberación de gliotransmisores como son el glutamato, la D-serina o el ATP, que en último lugar modulan la transmisión sináptica (Pascual et al., 2005; Perea and Araque,

2007; Martín et al., 2007; Navarrete and Araque, 2010; Henneberger et al., 2010; Navarrete et al., 2012). De modo que los astrocitos son células que muestran aumentos de calcio en respuesta a la actividad sináptica y estos aumentos pueden ser locales o pueden transmitirse a los astrocitos adyacentes, creando una onda de calcio que media la comunicación entre ellos. Así la actividad en una sinapsis puede modular la transmisión sináptica de otra más lejana mediante la generación de una onda de calcio y la posterior liberación de gliotransmisores (Navarrete and Araque, 2010; Gómez-Gonzalo et al., 2015).

1.2.3. El astrocito en la plasticidad sináptica

La participación de los astrocitos en la modulación de la transmisión sináptica ha sido demostrada por una gran cantidad de estudios que avalan su papel activo en distintos procesos de plasticidad sináptica. Así, los astrocitos no solo ejercen una acción de homeostasis y soporte trófico, sino que tienen una acción en muchos tipos de plasticidad sináptica de manera activa y principal (Hatten and Mason, 1990; Vernadakis, 1996). Estos responden a neurotransmisores que se liberan por los terminales sinápticos produciendo, a su vez, la liberación de gliotransmisores que interaccionan con sus receptores neuronales regulando la función neuronal y la actividad sináptica (Araque et al., 2001, Nedergaard et al., 2003; Volterra and Meldolesi, 2005, Haydon and Carmignoto, 2006; Theodosis et al., 2008; Perea et al., 2009; Parpura and Zorec, 2010; Araque et al., 2014; Covelo and Araque, 2016). De manera que estudios llevados a cabo por Kang y colaboradores comprobaron que la activación de los receptores GABA_B en los astrocitos del hipocampo induce la liberación de glutamato que actúa produciendo un incremento de la Pr de GABA en los terminales sinápticos inhibidores que reciben las neuronas piramidales de CA1 (Kang et al., 1998). Igualmente, se ha demostrado que la activación de GABA_B en los astrocitos del hipocampo induce la liberación de glutamato que, actuando sobre los mGluR 1/5 presinápticos, producen un incremento de la Pr de glutamato en neuronas piramidales de CA1 (Perea et al., 2016). Además, el glutamato puede inducir la liberación de ATP desde los astrocitos y generar una depresión de la transmisión

sináptica excitadora dependiente de la activación de receptores purinérgicos, según se observó en cocultivos de neuronas y astrocitos de hipocampo (Zhang et al., 2003).

Uno de los neuromoduladores que más interés ha suscitado y en el que se han basado muchos estudios son los endocannabinoides (eCB). Estos, al contrario de lo que hasta hace algunos años se conocía, no solo producen efectos supresores de la actividad sináptica excitadora e inhibidora, sino que pueden inducir un aumento de la transmisión glutamatérgica a través de la activación de los astrocitos. De manera que los eCB liberados postsinápticamente activan a los receptores CB1 astrocitarios, lo cual produce incrementos de calcio intracelular que se propagan en forma de ondas y que dan lugar a la liberación de glutamato (Navarrete and Araque, 2008, 2010; Min and Nevian, 2012). Este glutamato activa NMDAR extrasinápticos en neurona piramidales adyacentes, lo que hace que aumente su excitabilidad (Navarrete and Araque, 2008), y también activa mGluR1 en el terminal presináptico lo que desencadena una potenciación transitoria de la neurotransmisión en sinapsis relativamente lejanas (<150 μm) respecto a la sinapsis donde se liberaron los eCB (Navarrete and Araque, 2010). Pero, además, si coincide la señalización por astrocitos y el óxido nítrico (NO del inglés *nitric oxide*) liberado por la actividad postsináptica, se activa la PKC (del inglés *protein kinase C*) en el terminal presináptico y se produce una LTP en sinapsis relativamente lejanas (Gómez-Gonzalo et al., 2015). Es más, estudios recientes han comprobado cómo en el hipocampo, los astrocitos en función de la actividad neuronal pueden liberar diferentes gliotransmisores. Por tanto, los astrocitos tienen la capacidad de decodificar la actividad neuronal que se está produciendo en neuronas circundantes y liberar el gliotransmisor necesario para modificarla (Covelo and Araque, 2018).

Sin embargo, en la corteza de barriles la liberación de eCB activa a los astrocitos que a su vez liberan glutamato que al interaccionar con el NMDAR del terminal presináptico induce una LTD de la transmisión sináptica excitadora (Min and Nevian, 2012). Pero, además, se encontró que la estimulación de los axones aferentes colinérgicos libera acetilcolina que activan a los astrocitos de la corteza de barriles que liberan D-serina. Ésta, en último término, facilita la activación de los NMDAR

produciendo una LTP del potencial de campo evocado por la estimulación de las vibrisas (Takata et al., 2011). Esto pone de manifiesto la complejidad y singularidad de las acciones astrocitarias cuando se producen diferentes mecanismos en distintas áreas del SNC.

2. Corteza de Barriles

El neocórtex es la región del cerebro más evolucionada. Se caracteriza por dividirse generalmente en 6 capas y por tener funciones sensitivas/efectoras. Un área perteneciente al neocórtex es la corteza de barriles. Esta corteza tiene una gran importancia para los roedores, ya que procesa la información somatosensorial proveniente de las vibrisas, los bigotes especializados presentes en el hocico de estos roedores. Las vibrisas están localizadas en cinco filas de manera rostro-caudal y están especializadas en detectar diferencias de texturas, formas y, en definitiva, tienen una función de exploración y obtención de información que le es útil al animal para situarse en un entorno.

Así pues, cada bigote o vibrisa está inervada por axones del ganglio del trigémino a través de los cuales se transmite la información a diferentes núcleos del trigémino manteniendo la topografía de las vibrisas en los distintos núcleos del complejo trigeminal (Erzurumlu, 2010). A partir de aquí y en las distintas áreas de relevo de la vía somatosensorial, esta topografía se mantiene al existir grupos de neuronas que responden a la activación de una única vibrisa. En el complejo trigeminal estas agrupaciones se denominan barriletes. La siguiente estación de relevo es el tálamo. Las neuronas del complejo trigeminal mandan sus axones hasta los núcleos talámicos contralaterales. En el tálamo, estas agrupaciones neuronales se denominan barriloides. Por último, las neuronas talámicas proyectan a la corteza de barriles en las zonas de mayor densidad neuronal formando los barriles y manteniendo por tanto la topografía que se viene dando desde el trigémino (Pouchelon et al., 2012; Feldmeyer, 2012).

Pero la información no es transmitida de manera simple desde las vibrisas, sino que viaja por cuatro vías diferentes hasta llegar a la capa correspondiente de la corteza de barriles en función del tipo de información. Estas cuatro vías son la lemniscal dorsal,

extralemniscal, lemniscal y paralemniscal, siendo estas dos últimas las más estudiadas (Pouchelon et al., 2012). Así, la **vía lemniscal** transmite información relevante para la discriminación de texturas desde el núcleo principal del trigémino en su porción ventral pasando por el núcleo talámico ventral postero-medial (VPM) hasta la capa 4 de la corteza de barriles y la 5b y 6 (Arabzadeh et al., 2005; Pouchelon et al., 2012; Feldmeyer, 2012). Sin embargo, la **vía paralemniscal** está involucrada en el análisis sensorial y la modulación del comportamiento de movimiento de las vibrisas (Pouchelon et al., 2012; Feldmeyer, 2012). Transmite información desde el núcleo interpolar del trigémino al núcleo posterior medial (POm) talámico y de ahí hasta la capa 4 de la corteza de barriles. Por otro lado, la **Vía lemniscal dorsal** procesa la información sensorimotora (Urbain and Deschenes, 2007) que viaja por los axones de neuronas que se encuentran en las zonas fuera de los barriletes, los interbarriletes, desde los que se transmite a los barriloides del VPM y de aquí a la columna septal o zona interbarril en capa 4 cortical (Alloway, 2008). Por último, la **Vía extralemniscal** porta información dolorosa desde la porción interpolar del trigémino espinal a la porción ventrolateral del VPM y de aquí a las capas 2, 4 y 6 de la corteza de barriles (Pierret et al., 2000; Haidarliu, 2008).

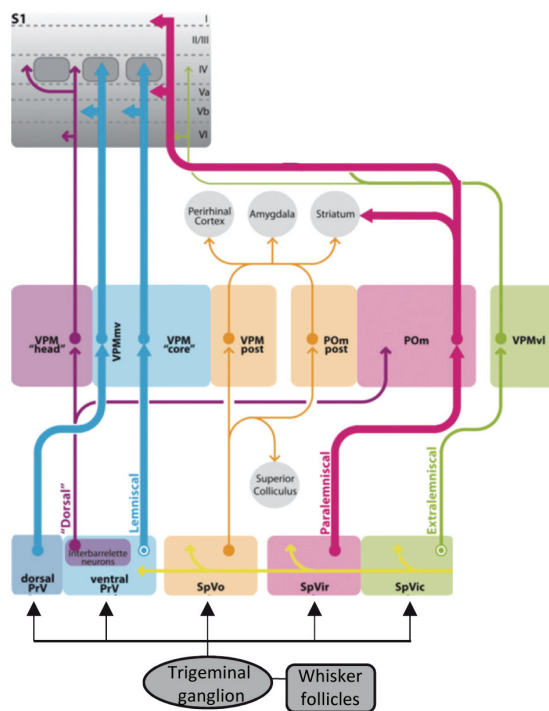


Figura 1. Esquema de las vías somatosensoriales. Representación de las vías que llevan la información somatosensorial desde los folículos de las vibrisas hasta la corteza de barriles. En ella se detallan las cuatro vías, lemniscal, paralemniscal, lemniscal dorsal y extralemniscal, y sus pasos por los distintos núcleos de relevo en el trigémino y en el tálamo hasta alcanzar las capas de la corteza. PrV, núcleo principal del trigémino; SpVo, núcleo espinal oral; SpVir, núcleo interpolar, rostral; SpVc, núcleo interpolar, caudal; SpVc, núcleo espinal caudal; VPMvl, núcleo VPM en su porción ventrolateral; VPMmv, núcleo VPM en su porción medioventral; S1, corteza somatosensorial primaria (Pouchelon et al., 2012).

3. Miedo condicionado

3.1. Adquisición del miedo condicionado

El miedo condicionado ha tomado mayor relevancia en los últimos años debido a su implicación en los procesos emocionales y de memoria (LeDoux, 2009). Es un aprendizaje asociativo que permite la representación de las posibles amenazas o estímulos aversivos y los estímulos que las predicen generando una representación neuronal del mundo que nos rodea. Este aprendizaje asociativo es el que ocurre en el condicionamiento Pavloviano. Ivan Pavlov, descubrió este tipo de aprendizaje mientras estudiaba en su laboratorio el reflejo de salivación en los perros durante la digestión. En estos experimentos se asociaba el sonido de una campana (estímulo condicionado) a la presencia de la comida (estímulo incondicionado), de tal modo que después del aprendizaje asociativo el simple hecho de escuchar la campanilla hacía que los perros comenzaran a salivar (respuesta condicionada) (Pavlov, 2010). Como ya se ha mencionado anteriormente, las bases celulares de este aprendizaje asociativo se asentaron con la "Teoría Hebbiana" enunciada por el psicólogo estadounidense Donald Hebb en 1949. Esta Teoría establece que cuando el axón de una neurona (neurona presináptica) activa a otra neurona repetidamente (neurona postsináptica) la eficacia sináptica de las sinapsis activadas entre ambas neuronas es aumentada. Esta teoría se simplifica como "las neuronas que disparan juntas, permanecerán conectadas" (Hebb, 1949a).

La amígdala es el núcleo efector de la respuesta del miedo. Está formada por cuatro núcleos incluyendo el lateral, el basolateral, el basomedial, y el central (Brodal, 1947). Sin embargo, se suele dividir en dos subsistemas con respecto al condicionamiento del miedo. El primer subsistema es el complejo basolateral (BLA), que está formado por los núcleos lateral, basolateral y basomedial. El otro subsistema está formado por el núcleo central (LeDoux, 1995; Maren and Fanselow, 1996). Así, el condicionamiento del miedo Pavloviano ha sido utilizado para evaluar el papel de la amígdala en el comportamiento emocional. De tal manera que se demostró la importancia de este conjunto de núcleos tanto en las respuestas emocionales

condicionadas como en la adquisición del miedo condicionado contextual (Blanchard and Blanchard, 1972). Dentro del complejo BLA, el núcleo lateral recibe la información auditiva y la somatosensorial mediante proyecciones directas del núcleo geniculado medial y del núcleo intralaminar posterior del tálamo. El núcleo lateral transmite la información al basolateral y este a su vez al núcleo central de la amígdala. De hecho, las lesiones en el lateral o en los núcleos talámicos anteriormente mencionados impiden la adquisición del miedo (Amorapanth et al., 2000), indicando que las conexiones tálamo-amigdalinas son necesarias para las respuestas condicionadas del miedo. Además, lesiones neurotóxicas en BLA, atenúan severamente la adquisición del miedo condicionado (Maren et al., 1996; Cousens and Otto, 1998).

Tras la aparición en escena del núcleo lateral de la amígdala, surgía el interrogante de si la plasticidad asociativa durante el miedo condicionado podría estar ocurriendo en este núcleo. Los resultados iniciales indicaban que la plasticidad en el núcleo lateral podría estar ocurriendo durante el miedo condicionado ya que las neuronas de éste muestran una LTP, y que el condicionamiento del miedo se asocia con cambios similares a los de la LTP en la transmisión sináptica tálamo-amígdala (Chapman et al., 1990). Fueron Quirk y cols. quienes comprobaron que las neuronas del núcleo lateral en su porción dorsal aumentaban su tasa de disparo a la vez que los animales muestran *freezing* (del inglés, congelamiento) durante la adquisición del miedo condicionado cuando se aparea el estímulo condicionado con el incondicionado (Quirk et al., 1995; Quirk et al., 1997). Estos resultados sugerían que la plasticidad en el núcleo lateral es de vital importancia en la memoria del miedo condicionado. Rompiendo la asociación entre estímulo condicionado e incondicionado (Quirk et al., 1995; Collins and Paré, 2000) se comprobó que el núcleo lateral amigdalino era el centro de codificación de la memoria del miedo (Goosens et al., 2003) y que era un centro clave de expresión de plasticidad asociativa. Así, si se aplica solo el estímulo incondicionado, los animales muestran *freezing* sin cambios en la tasa de disparo de las neuronas del núcleo lateral, mientras que si solo se aplica el estímulo condicionado no se observa ni *freezing* ni cambios en la actividad del núcleo lateral. Dado que el aumento de actividad en las neuronas de este núcleo ocurre antes de las respuestas

condicionadas, se estableció que era la causa del condicionamiento, existiendo neuronas que mantienen el aumento de actividad durante las memorias de extinción (Repa et al., 2001). Por tanto, las respuestas del miedo son debidas al aumento de actividad en el núcleo lateral de la amígdala y no al contrario.

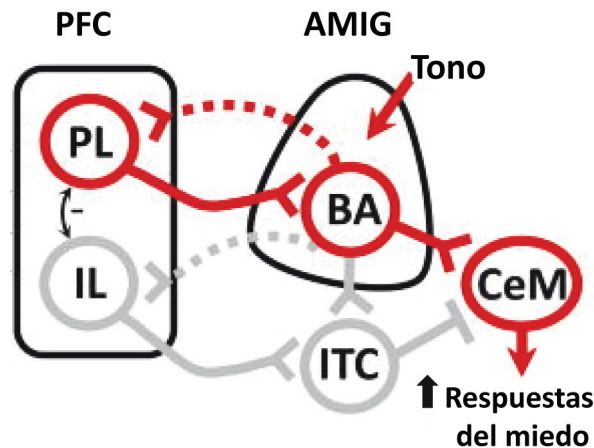


Figura 2. Circuito anatómico del miedo condicionado. Esquema simplificado en el que se muestra las distintas áreas que intervienen en la formación de la memoria del miedo condicionado y las conexiones entre ellas. En el esquema también se incluyen las vías que se activan (en rojo) y las que se inhiben (en gris) en respuestas al tono. (PL= corteza prelámbica, IL= corteza infralímbica, ITC= neuronas intercaladas, BA= núcleo basolateral de la amígdala, CeM= núcleo central medial). (Adaptado de Sotres-Bayon y Quirk, 2010).

3.2. Extinción del miedo condicionado

Hablamos de memoria de extinción cuando se eliminan conductas que habían sido consolidadas previamente durante la memoria del miedo condicionado. En esta memoria se crean nuevas conexiones que se fortalecen y compiten con las conexiones previas creadas en el condicionamiento, prevaleciendo sobre ellas. La memoria de extinción del miedo condicionado, como otras memorias, está formada por tres fases: adquisición, consolidación y recuerdo. La primera fase comienza cuando las respuestas condicionadas empiezan a disminuir ante el estímulo condicionado. Posteriormente, y con una duración de horas, se produce la fase de consolidación en la que se desencadena una memoria a largo plazo. Finalmente, la fase del recuerdo, en la que se observa una baja respuesta condicionada al presentar el estímulo condicionado.

Una de las primeras moléculas en ser involucradas en este proceso de aprendizaje fue el NMDAR. Diversos estudios relacionan su función con la creación de la memoria de extinción. Así pues, experimentos realizados con MK-801, un antagonista del NMDAR, administrado por vía sistémica impide la extinción del miedo (Baker and Azorlosa, 1996). Además, se realizaron experimentos con ifenprodilo, un antagonista de los NMDAR que contienen la subunidad NR2B, y se observó un bloqueo de la adquisición de la extinción (Sotres-Bayon et al., 2007). Por tanto, la activación de los NMDAR juega un papel importante en la adquisición, así como en el resto de fases de del proceso de extinción. Estudios similares han sido llevados a cabo usando nifedipino, un bloqueante de los canales de calcio dependientes de voltaje tipo L, obteniéndose como resultado un notable bloqueo de la extinción (Cain et al., 2002). Por tanto, es de vital importancia para los procesos de extinción del miedo condicionado las corrientes de calcio a través de los canales de calcio dependientes voltaje tipo L y a través de los NMDAR. Además se ha comprobado que los eCB son importantes para una correcta extinción, de modo que el bloqueo de su receptor CB1 (CB1R) disminuye los niveles de extinción (Marsicano et al., 2002). Asimismo se consiguen niveles mayores de extinción cuando se aplican agonistas de los CB1R (Pamplona et al., 2006). Esto sugiere que los flujos de calcio a través de los canales de calcio dependientes de voltaje tipo L y los NMDAR podrían inducir la liberación de eCB que actuarían amplificando la plasticidad relacionada con la memoria de extinción.

Un punto clave en la investigación sobre la extinción del miedo condicionado es saber en qué lugar del cerebro ocurre la plasticidad para que se dé la adquisición de la extinción. Un importante número de estudios se han llevado a cabo para dirigir este interrogante, analizado tanto el papel de la amígdala como el de la corteza infralímbica (IL), una de las subdivisiones de la corteza prefrontal medial (mPFC del inglés *medial prefrontal cortex*) implicadas en la memoria de extinción del miedo condicionado.

Anglada-Figueroa y Quirk demostraron que las lesiones en los núcleos basales de la amígdala antes de la adquisición de la memoria de extinción no afectan a este proceso pero bloquean el recuerdo de la extinción del miedo (Anglada-Figueroa & Quirk, 2005). Además otros estudios muestran que el bloqueo de los NMDAR en BLA impide la

adquisición de la extinción, siendo una estructura clave en la extinción del miedo condicionado (Falls et al., 1992; Lu et al., 2001; Lin et al., 2003). Por tanto, estos resultados demuestran que la activación de los NMDAR en BLA es fundamental para la adquisición del miedo y el núcleo basolateral dentro del BLA necesario para el recuerdo de esa extinción. Estudios recientes han demostrado que tras dos horas post-adquisición de la extinción se produce una sobrerregulación del RNAm de la proteína de unión al receptor de GABA, gefirina, lo que lleva a una mayor agrupación de receptores GABA_A en la zona activa de la sinapsis, desencadenando un efecto inhibitorio más potente (Chhatwal et al., 2005).

Pero la memoria de extinción del miedo condicionado compite con la memoria creada durante la adquisición. La IL envía proyecciones directas a la amígdala e inhibe la actividad del núcleo lateral amigdalino que a su vez inhibe al central reduciendo la respuesta de miedo condicionado y favoreciendo así la extinción. Estas conexiones son a través de unas interneuronas que se encuentran alrededor de ambos núcleos amigdalinos (lateral y central), las llamadas células intercaladas (Royer et al., 1999; Szinyei et al., 2000). A pesar de que inicialmente IL empieza a inhibir la actividad de los núcleos lateral y central de la amígdala, no es hasta 24 horas después del comienzo de la adquisición de la memoria de extinción cuando IL expresa la mayor actividad. Así diferentes estudios mostraron que, tras la lesión de la IL, los animales expresaban respuestas condicionadas durante la adquisición, pero no tenían una buena consolidación de la memoria de extinción (Quirk et al., 2000; Morgan et al., 2003; Lebrón et al., 2004). Sin embargo, otras investigaciones no han encontrado ningún efecto al lesionar IL (García et al., 2006; Farinelli et al., 2006).

En todo este entramado de proyecciones, también está interviniendo el hipocampo. Esta área tiene un papel importante en el procesamiento de la información del contexto en el que ocurre el miedo condicionado. Por tanto, el hipocampo entra en acción durante el proceso dependiente del contexto de la extinción (Corcoran and Maren, 2001). Así pues, la presentación del estímulo condicionado fuera del contexto donde se produjo el entrenamiento, produce un restablecimiento del miedo. Investigaciones llevadas a cabo al respecto muestran

cómo un daño en el hipocampo disminuye la respuesta de restablecimiento del miedo cuando el estímulo condicionado es presentado fuera del contexto de extinción (Corcoran and Maren, 2001; Zelikowsky et al., 2012). Es posible que el hipocampo actúe sobre la amígdala de manera directa o indirecta a través de IL (Thierry et al., 2000).

3.2.1. Corteza prefrontal medial: Corteza Infralímbica

La mPFC es un área imprescindible en los procesos de adquisición y extinción del miedo condicionado. Se encuentra en el lóbulo frontal, y está definida como una corteza agranular, es decir, que no posee capa 4, en homología con los primates y los humanos. Además otras características similares son las citoarquitectónicas, las proyecciones a otras áreas y los cambios electrofisiológicos en respuesta a tareas comportamentales (Campbell and Hodos, 1970; Kesner and Churchwell, 2011). La mPFC está formada desde un eje dorso-ventral, por la corteza cingular anterior (ACC), la corteza prelímbica (PL) y la corteza infralímbica (IL).

Como se ha comentado en párrafos anteriores, la IL es imprescindible para la formación de la memoria de extinción del miedo condicionado. Las aferencias excitadoras que recibe la IL están ampliamente distribuidas y proceden del tálamo, BLA de la amígdala, el hipocampo y la mPFC contralateral (Little and Carter, 2012; 2013). Las proyecciones procedentes de la BLA van a todas las capas de la IL menos a la capa 1, y hacen sinapsis con neuronas piramidales siendo minoritarias la sinapsis con las interneuronas parvalbúmina-positivas (Gabbott et al., 2006). Estas conexiones controlan la salida de la información de la mPFC y podría regular la actividad de la amígdala. Además, las proyecciones procedentes del hipocampo dorsal inervan la capa 1 y 5 de la IL y serían importantes en el procesamiento de la información contextual y espacial (Swanson, 1981).

Del mismo modo que la corteza es inervada por un amplio número de regiones, ésta también emite proyecciones a múltiples estructuras. La amígdala es una de ellas. IL inerva BLA a través de proyecciones glutamatérgicas desde las capas 2, 5 y 6 (DeFelipe and Fariñas, 1992; Hoover and Vertes, 2007). En concreto, sus eferencias

alcanzan la amígdala, concretamente el núcleo lateral en su porción ventral, el núcleo basomedial y el central en su porción lateral (Vertes, 2004). Otros estudios indican que IL proyecta a las neuronas intercaladas de la amígdala que controlan la salida de la información del núcleo central, participando por tanto en la extinción del miedo condicionado. Adicionalmente, IL proyecta a diferentes zonas de la sustancia gris periacueductal (Floyd et al., 2000), habiéndose sugerido un posible bypass de la amígdala en la generación de las respuestas condicionadas.

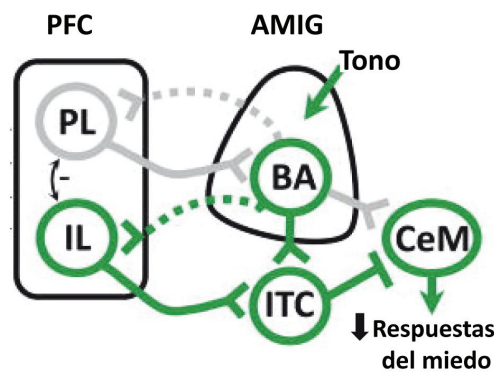


Figura 3. Circuito anatómico de la extinción del miedo condicionado. Esquema simplificado en el que se muestra las distintas áreas que intervienen en la formación de la memoria de la extinción del miedo condicionado y las conexiones entre ellas. En el esquema también se incluyen las vías que se activan (en verde) y las que se inhiben (en gris) en respuestas al tono. (PL= corteza prelámbica, IL= corteza infralímbica, ITC= neuronas intercaladas, BA= núcleo basal de la amígdala, Ce= núcleo central). (Adaptado de Sotres-Bayon y Quirk, 2010).

Uno de los mecanismos que explica la participación de IL en la extinción del miedo condicionado ha sido la modulación de las I_{AHP} y el aumento de la excitabilidad en neuronas piramidales de esta corteza. Un importante número de estudios han confirmado que después de inducirse la extinción del miedo condicionado las corrientes tanto mI_{AHP} como sI_{AHP} están reducidas en la IL, estando aumentada la excitabilidad en esta corteza (Santini and Porter, 2010; Fontanez-Nuin et al., 2011; Santini et al., 2012; Sepulveda-Orengo et al., 2013). Además de esta plasticidad observada de las propiedades intrínsecas, se ha observado un aumento de la ratio AMPA/NMDA durante la extinción en la IL, mostrando que durante la extinción se induce plasticidad sináptica a largo plazo (Fontanez-Nuin et al., 2011; Sepulveda-Orengo et al., 2013).

Conocer las áreas y los mecanismos subyacentes a la extinción del miedo condicionado es de gran importancia debido a que estos procesos pueden estar alterados en el trastorno por estrés postraumático, la ansiedad y/o las fobias. Algunos datos estadísticos arrojan un alto porcentaje de personas afectadas por estas patologías que cada vez son más agudas en cuanto a incidencias y consecuencias se refiere. De hecho, enfermedades como el estrés, la ansiedad o la depresión suponen actualmente más del 12% del total de enfermedades, con lo que se las conoce como “las enfermedades del siglo XXI”.

4. Factor de crecimiento insulínico tipo-I

El factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I del inglés *Insulin-like growth factor I*) es un péptido de 7.5 KDa, formado por 70 aminoácidos. Pertenece a la familia de los péptidos tipo insulínicos (IGF), cuyo grupo también engloba a la insulina y al factor de crecimiento insulínico tipo II (IGF-II). Es sintetizado principalmente por el hígado, aunque también por muchos otros tejidos, entre los que se encuentra el SNC.

Tras la insulina, el IGF-I fue descrito en los años 50 cuando se comprobó que la hormona de crecimiento (GH del inglés *growth hormone*) ejercía algunas de sus acciones de manera indirecta. En un primer momento se le llamó somatomedina. Aunque posteriormente y por su homología en un 50% a la insulina, se le acabó llamando factor de crecimiento insulínico tipo I (Rinderknecht and Humbel, 1978); Blundell et al., 1983).

4.1.Fisiología del IGF-I

El IGF-I es liberado por el hígado de manera periférica a través de la unión de la GH con su receptor, regulando la transcripción del gen del IGF-I. Entre las distintas acciones del IGF-I, la acción endocrina ha sido una de sus primeras formas de actuación descritas. A través de estudios de sus niveles en sangre, se puso de manifiesto que el hígado era el mayor productor de este factor de crecimiento. Sin embargo, estudios posteriores de explantes de diferentes tejidos fetales demostraron que el IGF-I era sintetizado por innumerables tejidos (por ejemplo, riñones, estómago, intestino, placenta, tronco del encéfalo, hipotálamo). Además, se comprobó que, en

ciertos tejidos de ratas adultas como hígado, riñón, pulmones, tenían altos niveles de IGF-I como para proceder del aporte sanguíneo. Esto le dotó de una acción local, ejerciéndola tanto a nivel autocrino como paracrino siendo el mayor determinante del crecimiento fetal en la mayoría de los mamíferos (D'Ercole et al., 1984). Además, los niveles de IGF-I circulante están correlacionados con el crecimiento postnatal, lo que pone de manifiesto la importancia del IGF-I sérico en el desarrollo del organismo. IGF-I sigue un patrón de expresión establecido durante el desarrollo, detectándose desde estadios embrionarios y comenzando a incrementar su expresión en los estados tardíos prenatales, continuando durante el desarrollo postnatal temprano. Durante la primera semana postnatal los niveles de IGF-I son máximos y posteriormente comienza a disminuir la expresión hasta mantenerse en unos niveles inferiores a los perinatales, durante la edad adulta, lo que sustenta su papel clave en la proliferación, diferenciación y maduración neuronal (Jones and Clemmons, 1995).

La división y diferenciación celular, el mantenimiento e integridad celular, entre otras, son acciones atribuidas al IGF-I. Por otro lado, también se le ha dado un papel importante en la prevención de enfermedades neurodegenerativas o contra el cáncer (Baffa et al., 2000; Carro and Torres-Aleman, 2004). Por lo tanto, el IGF-I es un factor trófico con una gran relevancia a muchos niveles del organismo, poniendo en relieve la importancia de este péptido y del mantenimiento de sus niveles para una homeostasis correcta. Aunque las neuronas son las principales células del sistema nervioso que sintetizan IGF-I, los astrocitos, oligodendrocitos y microglía son también una fuente importante (Ballotti et al., 1987; Shinar and McMorris, 1995).

4.2. Receptor de IGF-I

Los distintos tipos de péptidos insulínicos tienen la capacidad de unirse a más de un receptor de los otros miembros de la familia debido precisamente a su homología estructural, siendo el receptor propio el que posee mayor afinidad de unión. De tal manera que aunque existe cierta promiscuidad en la unión del péptido a su receptor, la afinidad de unión del IGF-I con su receptor (IGF-IR) es seis veces mayor que la afinidad de unión al receptor de IGF-II y cien veces mayor que la afinidad por el receptor de insulina (Annunziata et al., 2011).

El IGF-IR está formado por cuatro subunidades, dos alfas y dos betas. Las subunidades alfa forman la parte extracelular del receptor y por tanto la de unión a la molécula de IGF-I. Las subunidades beta tienen un dominio transmembrana y un dominio tirosina quinasa en contacto con el citoplasma. De igual manera que el IGF-I, el IGF-IR se expresa en todos los tipos celulares y también sigue un patrón espacial y temporal acorde con la expresión de su principal molécula de unión, empezando en el periodo embrionario, alcanzando sus máximos niveles durante el desarrollo perinatal y disminuyendo en la edad adulta. En roedores, las áreas con mayor expresión del receptor son la corteza cerebral, el hipocampo, el bulbo olfatorio, el cerebelo y los plexos coroideos. Además, a nivel celular se expresa en el cono de crecimiento neural, así como en las sinapsis, lo que es consistente con el papel clave del IGF-I en el crecimiento dendrítico, la maduración y la sinaptogénesis (Jones and Clemmons, 1995; Fernandez and Torres-Alemán, 2012).

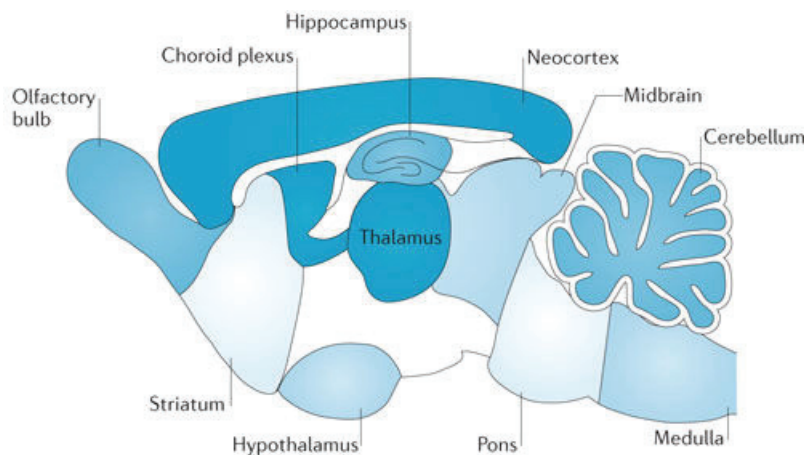


Figura 4. Distribución del receptor de IGF-I en el SNC. Localización del IGF-IR en el cerebro de ratones adultos. Niveles del IGF-IR corresponden a la intensidad del color azul. IGF-IR está principalmente en la Neocórtex, el hipocampo, el cerebelo, plexo coroideo y tálamo. (Adaptado de Fernández y Torres-Alemán, 2012).

La unión del IGF-I a la subunidad alfa del IGF-IR desencadena la autofosforilación del receptor y la siguiente unión a sustratos intracelulares. Estos sustratos son las proteínas adaptadoras conocidas como sustrato del receptor de insulina (IRS del inglés *Insulin receptor substrate*) y Shc.

Las IRS 1, 2 y 4 se expresan en las neuronas y células gliales en todo el SNC incluyendo la corteza cerebral, el hipocampo y los núcleos hipotalámicos (Foili et al., 1994), siendo IRS-1 el principal sustrato para la acción antiapoptótica del IGF-IR

(Peruzzi et al., 1999). Además, reclutan otras proteínas con dominio SH2 para activarlas en múltiples sitios de fosforilación. A partir de aquí se pueden iniciar al menos dos cascadas de señalización que comprenden la vía del IP3K/AKT, y por otro lado la vía de Ras/MAPK-ERK. Ambas en último término regulan la transcripción de genes y la síntesis de proteínas que regulan la translocación a la membrana plasmática de transportadores de glucosa, y los procesos de proliferación, supervivencia y apoptosis. Por tanto, queda bien sustentado el papel del IGF-I como factor de crecimiento así como protector celular ante estímulos apoptóticos (Grimberg and Cohen, 2000; Valentinis and Baserga, 2001; Fernandez and Torres-Alemán, 2012; Jung and Suh, 2015).

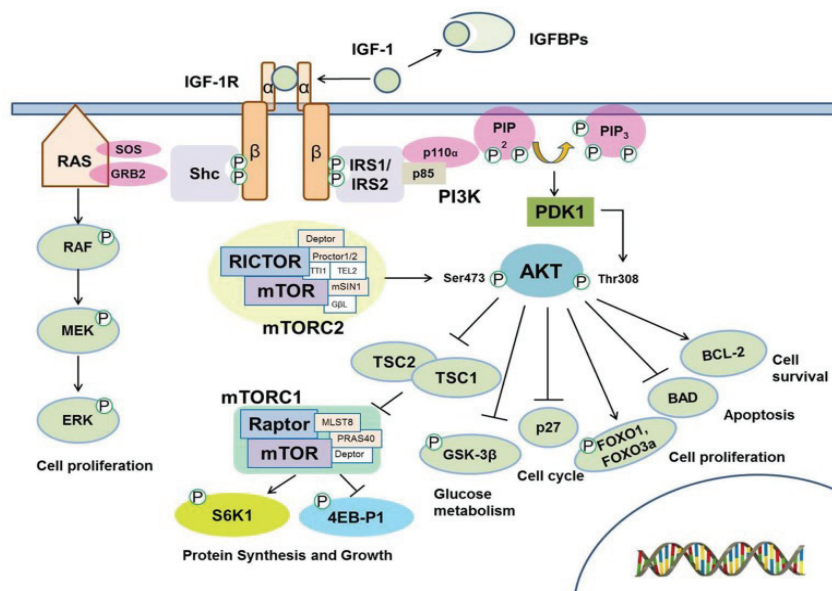


Figura 5. Rutas de señalización del IGF-1R.

Tras la unión del IGF-I a su receptor se pueden activar dos rutas de señalización, siendo estas Ras/ERK y IP3K/AKT. Esto hace posible las acciones del IGF-I en la proliferación, maduración, síntesis de proteínas, supervivencia y neuromodulación (Adaptado de Jung y Suh, 2015).

4.3. Proteínas de unión a IGFs

Las proteínas de unión a IGF (IGFBP del inglés *IGF bound proteins*. Proteínas de unión a IGF) es una familia de seis proteínas homólogas que se unen a IGF-I con alta afinidad y lo transportan desde la circulación hasta sus respectivos lugares de acción. La importancia de estas proteínas radica en el aumento de la viabilidad de las moléculas de IGF previniendo su proteólisis y por tanto aumentado su vida media. Por

tanto, la mayor parte del IGF-I circulante se encuentra unido a una de estas proteínas de unión, concretamente a la IGFBP3. Además, estas proteínas de unión también se encuentran en tejidos, ejerciendo un papel importante en las acciones del IGF-I. La expresión sérica de las IGFBP tiene un componente dependiente de la edad. Así pues, estas concentraciones cambian del feto a la edad postnatal, siendo los niveles de la IGFBP-1 y -2 mucho más elevados que los de la -3. Todas las IGFBP pueden ser fosforiladas o glicosiladas, lo que las hace más afines a la unión con el IGF-I y, por consiguiente, siendo un punto clave en la regulación de la acción de este. Sin embargo, también pueden sufrir proteólisis, lo que convierte este proceso en un factor limitante en la regulación de la función del IGF-I debido a su disminución en la liberación del factor de crecimiento. El sistema nervioso central expresa IGFBP-2, -4, -5 y -6 durante el desarrollo con patrones de expresión espaciales específicos y temporalmente coordinados. IGFBP-1 y -3 parece que no se expresa en el SNC en condiciones normales del desarrollo, pero en caso de daño, se induce la expresión de la IGFBP-3 (Lee et al., 1999).

4.4. Acciones del IGF-I

Numerosos ensayos han demostrado el papel clave del IGF-I en la proliferación (Zackenfels et al., 1995), diferenciación (Cheng and Mattson, 1992; Torres-Aleman et al., 1992) y maduración celular (Arsenijevic and Weiss, 1998; Brooker et al., 2000). Entre todos los tipos celulares que se encuentran en el sistema nervioso central, las neuronas son las primeras en desarrollarse. Aunque el sistema nervioso se desarrolla casi por completo antes del nacimiento, algunas áreas continúan desarrollándose postnatalmente, siendo el caso por ejemplo del hipocampo o el cerebelo. De hecho, se ha comprobado que la sobreexpresión de IGF-I promueve la diferenciación, incrementando el número de neuronas en estas áreas (Álvarez et al., 2016). En el cerebro adulto se han encontrado niveles de IGF-I mayores a los de su mRNA lo que indica que la circulación periférica actúa como fuente externa de IGF-I al SNC.

El IGF-I accede al cerebro desde la circulación periférica a través de los plexos coroideos y a través de la barrera hematoencefálica. Se han estudiado estos dos mecanismos de entrada:

1. Entrada por los plexos coroideos.

Para el transporte del IGF-I desde la sangre al líquido cefalorraquídeo a través del epitelio son imprescindibles tanto el IGF-IR como la proteína relacionada con el receptor lipoproteico de baja densidad transportadora de proteínas multicargo tipo 2. Una vez en el epitelio, IGF-I difunde fácilmente a áreas periventriculares y es transportado a zonas más profundas del cerebro mediante las IGFBP. De modo que IGF-I accede al líquido cefalorraquídeo desde la sangre de manera directamente proporcional a su concentración periférica. (Carro et al., 2000; 2005).

2. Entrada por la barrera hematoencefálica.

La entrada de IGF-I a través de la barrera hematoencefálica es actividad dependiente. El incremento de actividad neuronal produce la liberación de mediadores como son el ATP, la prostaglandina E2 o derivados del ácido araquidónico, los cuales incrementan la actividad de la metaloproteasa 9. Esta proteasa escinde la unión de IGFBP3 al IGF-I quedando por tanto libre y produciéndose la transcitosis a través de la barrera hematoencefálica (Nishijima et al., 2010).

4.4.1. Plasticidad sináptica e IGF-I

Algunos estudios han mostrado que el IGF-I induce una LTD de la transmisión sináptica inhibitoria mediante la disminución de la Pr de GABA por las células de Purkinje en el cerebelo cuando hay una activación de las fibras trepadoras (Castro-Alamancos and Torres-Aleman, 1993). Además, investigaciones realizadas en hipocampo y neocortex han demostrado que IGF-I induce la disminución de la liberación de acetilcolina (Kar et al., 1997). Posteriormente se confirmó que este efecto era mediado por la liberación de GABA que actúa a nivel del terminal colinérgico reduciendo la liberación de acetilcolina (Seto et al., 2002).

Pero el IGF-I no solo actúa modulando la liberación de acetilcolina, sino que estudios funcionales llevados a cabo en hipocampo de ratas jóvenes muestran cómo IGF-I es capaz de aumentar por mecanismos postsinápticos la transmisión sináptica excitadora mediada por AMPAR y no por NMDAR (Ramsey et al., 2005). Sin embargo, cuando los experimentos se realizan en animales adultos y viejos, el IGF-I aumenta

tanto el componente AMPA como NMDA de los potenciales postsinápticos excitadores (Molina et al., 2012). Se ha propuesto que el aumento del componente NMDA en animales adultos y viejos podría ser debido a un aumento en la expresión de las subunidades NMDAR2A y 2B que son más bajos en animales adultos comparados con animales jóvenes. De hecho, un estudio llevado a cabo por Sonntag y cols. demostró que el IGF-I revierte el declive en los NMDAR formados por las subunidades 2A y 2B en el hipocampo en ratas viejas a valores encontrados en animales jóvenes (Sonntag et al., 2000). Estos resultados dotarían al IGF-I de un papel importante en su acción frente a los efectos de la edad como son la pérdida de arborización neuronal y de NMDAR, cuya acción en procesos de aprendizaje y memoria es principal. Otros hallazgos más recientes han mostrado que tanto el IGF-I endógeno como el exógeno modulan el disparo de potenciales de acción (Gazit et al., 2016), lo que apoya resultados previos en los que se demuestra que el IGF-I modifica la extensión de los campos receptivos y el umbral de generación de potenciales de acción (Carro et al., 2000; Mysoet et al., 2015). Además, se ha demostrado que IGF-I puede modular el tamaño del árbol dendrítico en neuronas del bulbo olfatorio. Estas neuronas pueden liberar IGF-I a través de la proteína sensor de calcio sinaptotagmina-10 (Syt10) que determina la exocitosis de las vesículas contenedoras de IGF-I. Se ha comprobado que en el ratón *Knock out* para Syt10 (Syt10^{-/-}) existe una disminución del árbol dendrítico y una reducción del tamaño neuronal, revirtiéndose estos cambios al añadir IGF-I en los cultivos de neuronas procedentes de este ratón (Cao et al., 2011; Cao et al., 2013).

4.4.2. Astrocitos e IGF-I

Es sabido que IGF-I es uno de los gliotransmisores almacenados en los astrocitos. Además, se ha comprobado que el IGF-I regula el metabolismo de la glucosa en el SNC y que los astrocitos regulan los niveles de glucosa (Hernandez-Garzón et al., 2016; Logan et al., 2018). Adicionalmente, otras de las acciones del IGF-I en la que intervienen los astrocitos es en la protección contra el estrés oxidativo y frente a lesiones cerebrales traumáticas (Bellini et al., 2011; Madathil et al., 2013; Genis et al., 2014; Logan et al., 2018). Por otro lado, se sabe que este factor de crecimiento no solo controla la expresión del IGF-IR en neuronas (Costantini et al., 2010) sino que también

aumenta su expresión en los astrocitos durante la enfermedad de Alzheimer (Moloney et al., 2010). Sin embargo, y a pesar de que cada vez más estudios consolidan la acción neuromoduladora de IGF-I, aún se desconoce la intervención de los astrocitos en esta función.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Diferentes estudios han demostrado que el IGF-I puede modular la transmisión sináptica excitadora e inhibidora además de ejercer un control de la excitabilidad neuronal (Castro-Alamancos and Torres-Aleman, 1993; Sonntag et al., 2000; Seto et al., 2002; Nuñez et al., 2003; Ramsey, 2005; Molina et al., 2012; Gazit et al., 2016). Así se sabe que IGF-I aumenta la actividad del ECG registrado en la corteza de barriles (Trueba-Sáiz et al., 2013). Los astrocitos han demostrado ser muy importantes en la modulación de la transmisión sináptica. Además, pueden sintetizar IGF-I y presentan IGF-IR en su membrana plasmática. Aunque se sabe que durante la enfermedad de Alzheimer (Moloney et al., 2010) los niveles de expresión de IGF-IR en los astrocitos están aumentados, no existen suficientes datos hasta la fecha acerca del papel de los astrocitos en la plasticidad neuronal mediada por IGF-I. En consecuencia, con estos antecedentes nuestra primera hipótesis se basa en que **la activación de los IGF-IR en los astrocitos induce aumentos en la eficacia de la transmisión sináptica en las neuronas piramidales de capa 2/3 de la corteza de barriles, justificando así los aumentos de actividad registrados al aumentar los niveles de IGF-I en esta corteza.** Para demostrar esta hipótesis nos propusimos alcanzar los siguientes objetivos estudiando las neuronas piramidales de capa 2/3 de la corteza de barriles:

- 1.- Determinar si IGF-I aumenta la excitabilidad neuronal.
- 2.- Estudiar la modulación de la transmisión sináptica excitadora e Inhibidora inducidas por IGF-I en rodajas de la corteza de barriles.
- 3.- Determinar el efecto de IGF-I en la transmisión sináptica en ratones anestesiados.
- 4.- Estudiar si IGF-I induce metaplasticidad en la LTP dependiente de la activación de los NMDAR.

Por otro lado, los niveles de IGF-I se han relacionado con procesos emocionales, estando disminuidos en la mPFC de ratas con ansiedad asociada a diabetes mellitus (Aksu et al., 2012). Esta corteza es fundamental en la memoria del miedo condicionado, habiéndose demostrado que los aumentos de excitabilidad neuronal y

eficacia sináptica en neuronas piramidales de capa 5 de la IL facilitan la memoria de extinción (Fontanez-Nuin et al., 2011; Santini et al., 2012; Sepulveda-Orengo et al., 2013). Sin embargo, se ha comprobado que los niveles de los IGF-IR disminuyen durante el condicionamiento del miedo y no aumentan durante la extinción en la corteza prefrontal (Ogundele et al., 2017). Dado que el IGF-I produce aumentos de la resistencia de membrana neuronal (Nuñez et al., 2003) y aumentos de la eficacia sináptica (Ramsey, 2005; Molina et al., 2012), nuestra segunda hipótesis propone que **IGF-I aumenta la excitabilidad y la eficacia sináptica de las neuronas piramidales de capa 5 de la IL facilitando la memoria de extinción del miedo condicionado**. Para demostrar esta segunda hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos estudiando las neuronas piramidales de capa 5 de la IL:

- 1- Analizar si los aumentos en los niveles de IGF-I en la corteza infralímbica facilitan la memoria de extinción del miedo condicionado.
- 2- Estudiar si IGF-I aumenta la excitabilidad neuronal en la corteza infralímbica in vitro.
- 3.- Estudiar la modulación de la transmisión sináptica excitadora e inhibidora en rodajas de la corteza infralímbica.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Declaración ética

Todos los procedimientos para el manejo y sacrificio de los animales siguieron las Guías de la Comisión Europea (2010/63/EU). Los protocolos empleados fueron supervisados por el gabinete veterinario de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid. Todos los esfuerzos fueron realizados para minimizar el número y sufrimiento de los animales.

2. Animales de experimentación

En los experimentos llevados a cabo en la corteza de barriles se utilizaron ratones de la cepa C57BL/6 de 12-17 días postnatales. En los experimentos realizados *in vivo* se utilizaron ratones de 2-3 meses de edad de la misma cepa y un peso de 23-27 g. Los ratones fueron de ambos sexos indistintamente.

Para los experimentos de registros en corteza IL se trabajó con ratas Sprague Dawley de 12-17 días postnatales de ambos sexos indistintamente. En los procedimientos de miedo condicionado las ratas fueron de 30-40 días postnatales de la misma cepa y un peso de 110-130 g. En este caso se trabajó con ratas macho para disminuir posibles variables causadas por los ciclos hormonales que experimentan las hembras.

Todos los animales fueron obtenidos y estabulados en el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid siguiendo los criterios de peso establecido por los atlas anatómicos para la toma correcta de referencias estereotáxicas (Paxinos and Watson, 2004; Paxinos and Franklin, 2008). Hasta el día del procedimiento el animal tuvo acceso al agua y la comida *ad libitum*.

3. Obtención del encéfalo y preparación de rodajas

Los animales fueron decapitados e inmediatamente se extrajo el cerebro por craneotomía y se colocó en una solución de corte a 4°C que contenía (en mM): 189.0 sacarosa, 10.0 glucosa, 26.0 NaHCO₃, 3.0 KCl, 5.0 Mg₂SO₄, 0.1 CaCl₂, 1.25 NaH₂PO₄·2H₂O, burbujeado constantemente con carbógeno (95% O₂ y 5% CO₂). Las rodajas fueron realizadas con un grosor de 350-400 µm con un vibrátomo (Leica VT 1200S). Posteriormente las rodajas fueron colocadas en una cámara de mantenimiento con líquido cefalorraquídeo artificial (LCA) a temperatura ambiente (20-25°C) que contenía (en mM): 124.00 NaCl, 2.69 KCl, 1.25 KH₂PO₄, 2.00 Mg₂SO₄, 26.00 NaHCO₃,

2.00 CaCl_2 y 10.00 glucosa con un pH de 7.3-7.4 burbujeado continuamente con carbógeno. Una vez transcurrida al menos una hora de incubación y recuperación, las rodajas fueron transferidas a la cámara de registro la cual contenía 2 ml de LCA burbujeado constantemente con carbógeno con una perfusión de flujo constante de 2ml/min.

En los experimentos en los que se aislaron las corrientes postsinápticas excitadoras (EPSC) se añadió al LCA, PiTX (50 μM), antagonista de los receptores GABA_A (Receptores ionotrópicos activados por GABA de tipo A). Por el contrario, cuando se aislaron las corrientes postsinápticas inhibitoras (IPSC) se añadió al LCA, CNQX (20 μM) + D-AP5 (50 μM), antagonistas de receptores ionotrópicos de glutamato de tipo AMPA y NMDA respectivamente.

4. Identificación de capas y tipos neuronales

Las células se visualizaron usando un microscopio de epifluorescencia Olympus BX50WI (Olympus Optical, Japón) equipado con contraste de interferencia diferencial (DIC). Los objetivos usados fueron de 10x y 40x de inmersión en agua y una cámara CCD ORCA R² (Hamamatsu photonics, Japón). La visualización de las capas tanto 2/3 de la corteza de barriles como la capa 5 de la corteza infralímbica fue llevada a cabo con el objetivo 10x. La capa 2/3 se identificó mediante su delimitación con los barriles de la capa 4 y con la capa 1 con una menor densidad de somas. En cambio, para la capa 5 de la corteza infralímbica al tener una delimitación entre cortezas más difusa se tomó como referencia el fórceps menor del cuerpo calloso y la fisura rinal.

Tras identificar las diferentes capas de interés, se cambió al objetivo 40x para el reconocimiento celular. Las neuronas piramidales fueron seleccionadas por su mayor tamaño y forma piramidal, y un inicio de su dendrita apical hacia capas más superficiales. Tras el reconocimiento visual, las neuronas se identificaron en base en su patrón de disparo de potenciales de acción y a la relación corriente-voltaje o IV en respuesta a la aplicación de pulsos conocidos de corriente (Markram et al., 2015) (ver fig. 9).

5. Registros electrofisiológicos

5.1. Técnica de patch clamp ex vivo

Se llevaron a cabo registros electrofisiológicos de neuronas piramidales de capa 2/3 de corteza de barriles de ratón y capa 5 de corteza infralímbica de rata mediante la técnica de *patch clamp* en su configuración de célula completa (del inglés *whole cell*) en los modos de fijación de voltaje y de corriente (del inglés *voltage-clamp* (VC) y *current-clamp* (CC)). Los registros fueron hechos con pipetas de borosilicato (OD-ID: 1.5-0.86; Sutter Instrument CO., Novato, CA), con una resistencia de 4-8 M Ω y se llenaron con una solución intracelular que contenía (en mM): 120 K-Gluconato, 10 KCl, 10 HEPES, 0.5 EGTA, 4 Na₂-ATP, and 0.3 Na₃-GTP, 10 NaCl ajustado a pH 7.2–7.3 con KOH. En los experimentos en los que se registraron simultáneamente las EPSC a -60 mV (potencial de reversión de la corriente sináptica inhibitoria), y las IPSC a 0 mV (potencial de reversión de la corriente sináptica excitadora) se usó la siguiente solución intracelular (en mM): 112.5 Cs-Gluconato, 20 HEPES-K, 0.2 EGTA, 4 Na₂-ATP, 0.3 Na₃-GTP, 8 CsCl₂, pH 7.3-7.4 (\approx 280 mOsm). En el caso en los que se registraron astrocitos para bloquear sus aumentos de calcio intracelulares, los capilares utilizados tuvieron una resistencia de entre 6-8 M Ω y la solución intracelular usada tuvo la siguiente composición (en mM): 40 BAPTA-K₄, 2 ATP-Na₂, 10 HEPES, 1 MgCl₂ and 8 NaCl, pH 7.3.

Los registros se hicieron usando un amplificador Cornerstone PC-ONE (DAGAN, Minneapolis, MN). Las pipetas fueron situadas con un micromanipulador mecánico (Narishige, Tokyo, Japan). El potencial de membrana se ajustó a -60 mV y la resistencia en serie fue compensada al 50 % aproximadamente y monitorizada durante todo el experimento aplicando un pulso intracelular de 3 mV durante 5ms. Las neuronas fueron aceptadas solo cuando la resistencia del sello fue superior a 1 G Ω y la resistencia en serie no cambió en un 20 % durante el experimento. Las señales fueron filtradas a 3 KHz y muestreadas a 10 KHz con una tarjeta de conversión analógico-digital Digidata 1500A (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Las respuestas sinápticas fueron evocadas mediante estimulación bipolar con dos cables de plata clorurados (Ag/AgCl) introducidos independientemente en una pipeta septada (World Precision

Instruments). Los capilares fueron llenados con LCA y conectados a una unidad de aislamiento del estímulo (Quincy, USA) controlada por un estimulador (Cibertec-Stimulator CS220) y siendo localizados a unas 100 μm de distancia de la pipeta de registro, de tal modo que estimulara las aferentes que sinaptan en las dendritas basales de neuronas piramidales. Para la generación de estímulos, adquisición y almacenamiento de datos fue empleado el programa pCLAMP 10.2 (Molecular Devices).

5.2. In vivo

Para los registros de potenciales locales de campo evocados (LFP del inglés *local field potencial*) se utilizó un electrodo de tungsteno (World Precision Instruments) de 1-2 M Ω posicionado en las coordenadas estereotáxicas pertenecientes a la corteza de barriles (AP: -1,58 mm; L: 3 mm; DV: 0,15-0,30 mm) mediante un micromanipulador eléctrico (David Kopf Instruments, Tujunga, California, EE.UU.). La señal analógica fue amplificada 1000 veces y filtrada entre 0,3-300 Hz con un amplificador DAM80 (World Precision Instruments). Las señales electrofisiológicas fueron muestreadas a 1KHz tanto por un conversión analógico-digital Digidata 1500A (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) controlada por el software pCLAMP 10.2 (Molecular Devices).

5.3. Estimulación sináptica

Los capilares se conectaron a un estimulador (Cibertec-Stimulator CS220) a través de unidades de aislamiento (Isolation Unit MOD-100). En el caso de la corteza somatosensorial, la pipeta se colocó en la capa 4, a 100 μm del soma de las neuronas piramidales. Del mismo modo, en la corteza infralímbica el capilar se situó en la capa 6 a 100 μm de la neurona piramidal a registrar.

5.4. Paradigmas de estimulación y análisis de datos

- Bulk stimulation

Se aplicaron pulsos de corriente (100- μs de duración y 20–100 μA) a 0.3 Hz a través del electrodo de estimulación mientras la célula se registraba en modo de VC. Tras 5 minutos de registro estable (línea base) de las corrientes postsinápticas (PSC del inglés *postsynaptic currents*), se cambió al modo CC y se tomó un registro de potenciales

postsinápticos (PSP del inglés *postsynaptic potentials*) durante 5 minutos a 0.2 Hz y a una intensidad de estimulación cerca del umbral de generación de potenciales de acción, de tal manera que alrededor del 10% de las respuestas fueran supraumbrales. Tras estos 5 minutos, se perfundió el IGF-I en el baño y se continuó el registro durante 15 minutos más con los mismos parámetros de estimulación. Finalizado este periodo, se volvió a los parámetros de estimulación registrando en VC durante 20 minutos, tras los cuales el IGF-I fue lavado durante 20 minutos. De igual modo para los experimentos en los que se midieron los PSP, pero en lugar de tomar 5 minutos de línea base estable de PSC, se tomó el mismo tiempo, pero de PSP a una intensidad de estimulación lejana del potencial de umbral.

En algunos experimentos se registraron las EPSC a -60 mV y las IPSC a 0 mV en la misma célula. Tras 14 minutos de línea base estable de corrientes tanto excitadoras como inhibitoras se usó el mismo protocolo de inducción explicado en el caso anterior, para posteriormente volver a VC con los valores controles de estimulación sináptica (Fig 6).

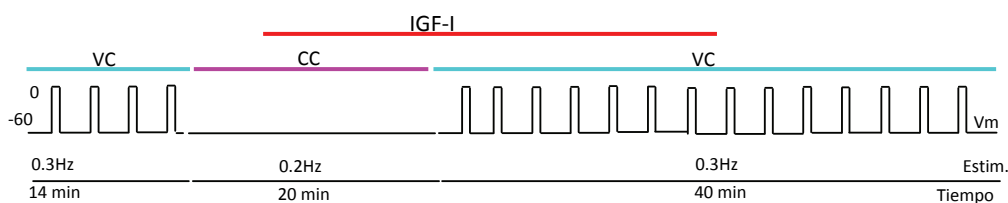


Figura 6. Protocolo de registro de las EPSCs e IPSCs en la misma célula. Protocolo utilizado para registrar las EPSCs evocados a -60 mV y las IPSCs evocados a 0 mV. Vm (voltaje de membrana), Estim. (Frecuencia de estimulación), VC (voltage-clamp), CC (current-clamp).

5.4.1. Corrientes lentas de K^+ activadas por Ca^{2+} (sl_{AHP})

Se aplicaron pulsos despolarizantes de 60 mV durante 800 ms a 0,2 Hz a través de la pipeta de registro para evocar la sl_{AHP} . La magnitud de la corriente se determinó midiendo la amplitud del pico del promedio de cinco estímulos, con un intervalo cada cinco estímulos de 11 s.

Tras el registro control estable se añadió al baño IGF-I y se continuó la estimulación en el tiempo para medir el efecto de éste sobre las corrientes. Pasados 30 minutos, el

IGF-I fue lavado. En algunos experimentos, después de obtener una línea base estable de las sl_{AHP} se paró su generación y se perfundió el IGF-I durante 20 minutos para luego volver a evocar la sl_{AHP} .

5.4.2. Excitabilidad neuronal y resistencia de membrana (R_m)

Para analizar los posibles cambios en la excitabilidad neuronal inducidos por el IGF-I se aplicaron pulsos de corriente desde más hiperpolarizantes a despolarizantes para medir la respuesta en voltaje y poder crear curvas I-V relacionando el pulso de corriente aplicado y el voltaje de la neurona. Los pulsos tuvieron una duración de 800 ms con una intensidad de 150 pA a incrementos de 25 pA. En el análisis se tomó el primer pulso de corriente en la IV que generaba potenciales de acción antes y durante IGF-I, y se contaron el número de potenciales de acción como respuestas individuales. Además, se ajustaron a una recta los puntos de la curva I-V con comportamiento lineal y la pendiente de esa recta nos permitió calcular R_m ($R_m = (V_1 - V_0) / (I_1 - I_0)$) antes y durante la aplicación de IGF-I.

5.4.3. Plasticidad dependiente del tiempo de disparo de la espiga (STDP, spike timing-dependent plasticity)

Se registraron 5 minutos de PSP como línea base estable. A continuación, se asoció el PSP con un pulso despolarizante de 0,4 nA con un intervalo de tiempo entre ambos de 10 ms. Para comprobar el número necesario de asociaciones para producir la LTP se hicieron apareamientos de 10, 20 y 50 PSP-PA para, posteriormente, continuar con el registro de PSP 40 minutos. Otro grupo de experimentos fueron llevados a cabo en las mismas rodajas en las que se había realizado antes experimentos con IGF-I (Ver fig. 29), concretamente en neuronas cercanas a las que se habían registrado previamente.

5.4.4. Estimulación sensorial

La estimulación sensorial de las vibrisas se realizó mediante pulsos de aire (*Puffs*) de 20 ms de duración eyectados con una bomba de presión neumática (Picospritzer, Parker Hannifin, EE.UU.) conectada a un tubo de polipropileno de 0,5 mm. Los *puffs* se aplicaron sobre una única vibrisa de tal modo que el resto fueron recortadas para evitar interferencias o movimientos complejos. La presión se ajustó a 1-2 Kg/cm² de

manera que se generara un movimiento de retracción de 15°. Tras comprobar que podíamos registrar un LFP debido a la estimulación de la vibrisa (10 ± 2 ms de latencia del inicio de LFP respecto a la estimulación de la vibrisa), se tomó una línea base estable de LFP a una frecuencia de 0,2 Hz durante 15 minutos. A continuación, se hicieron 6 inyecciones de IGF-I ($10 \mu\text{M}$) 84 nl/min durante un minuto cada una, separadas 5 minutos entre ellas, con una ultramicrobomba de perfusión (World Precision Instruments). Finalmente, se continuó el registro durante una hora para comprobar el efecto del IGF-I sobre el área del LFP. Los registros fueron medidos promediando el área del LFP de 12 estímulos y se hicieron representaciones de 5 en 5 minutos. Para calcular el área, se tomó el inicio de la pendiente del LFP y el mismo punto en la pendiente final de éste.

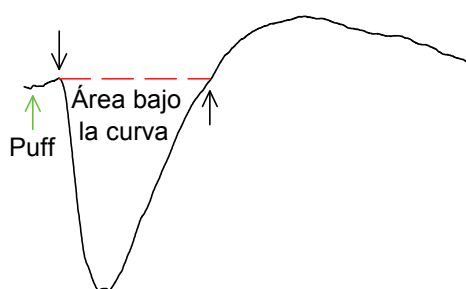


Figura 7. Representación de la medida de un potencial de campo evocado. Representación gráfica de un potencial de campo evocado en la capa 2/3 de la corteza de barriles mediante la estimulación con puffs de aire de las vibrisas contralaterales (flecha verde), en la que se puede observar su área bajo la curva (área bajo la línea discontinua roja) y los puntos de su delimitación para la medida (flechas negras).

6. Procedimientos quirúrgicos

Para los registros electrofisiológicos en corteza somatosensorial, ratones de la cepa C57BL6/J con un peso aproximado de entre 23-27 g fueron utilizados. Los mismos estuvieron estabulados en jaulas de plástico bajo un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad con acceso a comida y agua *ad libitum*.

Las cirugías se llevaron a cabo utilizando uretano (1,4 g/Kg) como anestésico con una administración intraperitoneal. Se usó lidocaína (Xilonibsa 2%) en todas las incisiones como anestésico local. Además, se utilizaron dosis suplementarias de uretano cuando se advirtieron signos de reflejo o cambios en frecuencias lentas en el ECG superiores a la banda delta (0-4 Hz). En los experimentos en los que se implantaron cánulas de perfusión se utilizaron ratas Sprague-Dawley con un peso de

entre 110-130 g con las mismas condiciones de estabulación que las descritas para los ratones. En este caso, las cirugías fueron realizadas al menos una semana previa a la realización de los procedimientos comportamentales para su completa recuperación. Como anestésico de inducción se utilizó un cóctel de ketamina 70 mg/Kg (Ketolar®), xilacina 5 mg/Kg (Rompum®) y atropina 0,05 mg/Kg (B. Braun Medical S.A.). Como anestésico de mantenimiento se usó isoflurano con un flujo de 1-1,5/min (2-3%). Una vez las ratas fueron anestesiadas, se les inyectó subcutáneamente como analgésico buprenorfina 0,075 mg/Kg (Buprex®) previa incisión. Además, se les administró dosis repetidas durante las 72 horas siguientes a la intervención quirúrgica para minimizar los signos de dolor.

Una vez comprobado que los animales carecían de reflejos por el efecto de la anestesia, se colocaron en el estereotáxico con una manta térmica a 38 °C para evitar la hipotermia, se les aplicó vaselina en los ojos para evitar la desecación de las corneas y se hizo la posterior incisión longitudinal a lo largo de la línea media previa aplicación de antiséptico sobre la piel (Betadine®). Se desplazó la piel y se retiró el periostio dejando al descubierto el cráneo para la craneotomía. Comprobado el correcto alineamiento de lambda y bregma, se localizaron las coordenadas estereotáxico de acuerdo con Paxinos y Watson y se hizo la trepanación de 1 mm² aproximadamente con una trepanadora (Dremel®) hasta dejar una lámina fina ósea, la cual fue extraída posteriormente para minimizar el daño del tejido cerebral y el sangrado.

En el caso de los ratones, un electrodo de tungsteno de 1 MΩ (World Precision Instrument, Reino Unido) fue introducido para el registro electrofisiológico que será descrito en apartados posteriores. Sin embargo, para las ratas, después de realizar la craneonotomía se introdujo una cánula guía de acero inoxidable de 26 gauge (PlasticsOne®) con un ángulo de 11° y se fijó al cráneo con cemento dental. Secado el cemento se suturó la piel de los animales con seda trenzada estéril y se devolvieron a sus lugares de estabulación con un control visual de su correcta recuperación hasta el momento de la realización de los experimentos comportamentales.

7. Procedimientos comportamentales

Para los experimentos comportamentales se implantaron cánulas al menos siete días antes de llevarlos a cabo, como se ha descrito en el apartado anterior.

Durante dos o tres días las ratas fueron manipuladas al menos 15 minutos al día para minimizar el estrés que supondría al animal la exposición por primera vez al investigador.

En los experimentos se usaron dos contextos distintos, una cámara de condicionamiento operante o Caja de Skinner cuya forma es cuadrada y su base está formada por una serie de rejillas que transmiten la electricidad por su material de acero inoxidable (usada para el condicionamiento del miedo), y otra de forma triangular, incluyendo la base, y sólida de polietileno (usada para la extinción del miedo condicionado y el recuerdo de la extinción). Ambos contextos estuvieron colocados dentro de una caja de aislamiento sonoro con una cámara acoplada en la parte superior para grabar las sesiones, y un ventilador que aplicaba un sonido de 60 dB como atenuador de ruido ambiental. Tanto el condicionamiento como la extinción se hicieron cambiando completamente todas las condiciones tanto de luminosidad como olorosa y sonora, dejando exclusivamente el sonido neutro del ventilador.

El test comportamental se realizó en cuatro días, cada uno de los cuales siguió una fase diferente. El primer día (Día 1) se les sometió a seis sesiones de habituación del contexto, tres en cada caja contextual y sus condiciones ambientales asociadas. La habituación consistió en un sonido o estímulo condicionado a 4 KHz durante 30 s con una intensidad de 80 dB. El segundo día (Día 2) se realizó la fase de condicionamiento. Esta fase consistió en tres sesiones en las cuales se asoció el estímulo condicionado con un choque eléctrico o estímulo incondicionado en las patas de 0,4 mA y una duración de 0,5 s acoplado en el último medio segundo del estímulo condicionado o sonido. El tercer día (Día 3) fueron llevados a cabo los ensayos de extinción del miedo condicionado en los que, además de cambiar completamente el contexto utilizado para el condicionamiento como se ha descrito anteriormente, se aplicaron 20 estímulos condicionados sin el estímulo incondicionado. Por último, el cuarto día (Día

4), se sometió a las ratas al recuerdo de la extinción con las mismas condiciones de la extinción a diferencia de que se realizaron 5 ensayos.

En algunos experimentos, el día 3 fue suprimido como control de una correcta consolidación del miedo condicionamiento (Grupo Ctrl Cond). En los experimentos en los que se implantó una cánula guía, media hora previa al comienzo de la extinción del miedo condicionado (comienzo del día 3), se efectuó la perfusión de 0,5 μ l/min durante 1 minuto de IGF-I (10 μ M; Grupo IGF-I), NVP-AEW541+IGF-I (40 μ M+10 μ M; Grupo NVP-AEW541+IGF-I) o suero salino 0,9 % (Grupo salino), según el grupo al que pertenecieran, con una cánula de inyección de 33 gauges (PlasticsOne) acoplada a una ultramicrobomba de perfusión (World Precision Instruments).

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
GRUPO	HABITUACIÓN	CONDICIONAMIENTO	EXTINCIÓN	RECUERDO
Ctrl Cond	Si tono, No shock	3 tonos-shock	No entrenamiento	5 tonos
Ctrl Ext	Si tono, No shock	3 tonos-shock	20 tonos	5 tonos
IGF-I	Si tono, No shock	3 tonos-shock	20 tonos	5 tonos
Salino	Si tono, No shock	3 tonos-shock	20 tonos	5 tonos
NPV+IGF-I	Si tono, No shock	3 tonos-shock	20 tonos	5 tonos

Figura 8. Esquema de los procedimientos comportamentales en los distintos grupos de animales. Representación esquemática de la organización de las diferentes sesiones por días y grupos experimentales. Ctrl Cond (grupo control condicionado), Ctrl Ext (grupo control extinguido), IGF-I (grupo en el que se inyectó IGF-I), Salino (grupo al que se le inyectó suero salino), NVP-AEW541+IGF-I (grupo al que se le inyectó NVP-AEW541+IGF-I).

Tras finalizar los experimentos de conducta, algunos animales fueron utilizados para obtener rodajas de su cerebro y poder medir las corrientes sl_{AHP} en sus neuronas piramidales de capa 5 de la IL en las distintas condiciones (ver apartado 6. Paradigmas de estimulación). El resto se usó como control de cánula.

8. Perfusión transcardiaca y tratamiento histológico

El procedimiento de perfusión transcardiaca comenzó con una inyección letal de pentobarbital sódico (80 mg/Kg) para eliminar signos dolorosos o de reflejos. La cirugía comenzó con apertura de la cavidad abdominal, se cortó la parrilla costal cortando el diafragma y dejando expuesto el corazón. Tras retirar el pericardio, se introdujo una aguja hipodérmica con el extremo romo en el ventrículo izquierdo. La aguja estaba conectada a una bomba peristáltica que permitió el flujo de suero salino 9 % que retiró la sangre del sistema circulatorio a través de una incisión en la aurícula derecha

permitiendo así la evacuación de la misma junto con el suero. Una vez eliminada toda la sangre, se introdujeron 500 ml de paraformaldehído (PFA) al 4 % en tampón fosfato (PB) 0,1 M con el mismo sistema. A continuación, y una vez bien fijado el tejido, se extrajeron los encéfalos y se mantuvieron en postfijación entre 48-72 horas en la misma solución de PFA. Trascurrido este tiempo, se sumergieron en solución de sacarosa al 30 % en PB 0,1 M en agitación para crioproteger el tejido.

La tinción de Nissl se usó para delimitar la localización de trazos de las cánulas. Los cerebros se extrajeron de la sacarosa, se cortaron en plano coronal con un micrótopo de congelación a 50 μ m de grosor y se montaron en PB 0,1 M de manera antero-posterior sobre un portaobjetos. Se dejaron secar durante la noche, se rehidrataron con agua destilada durante 5 s y se sumergieron en violeta de cresilo al 2 % durante 5 minutos en agitación a 45 °C de temperatura. Se lavó el tinte y se pasaron los cortes por alcohol de 70 ° durante 30 s y de 96 ° otros 30 s para deshidratarlos. A continuación, se sumergieron en cloroformo al 100 % durante 10 minutos, se hizo un lavado en alcohol de 96 ° y se introdujeron en diferenciador (980 ml de etanol de 96 ° y 20 ml de ácido acético glacial) hasta que la sustancia blanca se diferenció de la gris por un color más blanquecino. Por último, se lavaron los cortes en alcohol de 100 ° durante 1 minuto y se hicieron 6 aclarados de 10 minutos con xileno. Al acabar el proceso se cubrieron con un cubreobjetos impregnado con el medio de montaje DePex (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Alemania).

9. Monitorización de los aumentos de Ca^{2+} astrocitarios

Las rodajas, una vez estabilizadas, se incubaron en LCA con 2 μ l de Fluo4-AM al 0,02 % en ácido plurónico, sobre la corteza somatosensorial durante 20-30 minutos a temperatura ambiente (\approx 25 °C). Después del tiempo de llenado, se devolvieron las rodajas a la cámara de mantenimiento para aclarar el exceso de Fluo4 AM durante al menos 15 minutos.

Las elevaciones de calcio en los astrocitos de la capa 2/3 de la corteza de barriles fueron monitorizadas usando un microscopio de epifluorescencia para poder visualizar las emisiones del indicador Fluo4-AM. Este compuesto es excitable a longitudes de onda del espectro visible, siendo sus máximas longitudes de onda de excitación y

emisión de 495/506 nm respectivamente. Además, es una molécula muy útil en la detección de calcio intracelular debido a que en condiciones de baja concentración de calcio apenas emite fluorescencia, pero cuando el calcio aumenta puede llegar a unos aumentos de esta de más de 100 veces. La fluorescencia fue detectada y registrada por un cámara CCD (Luca, Andor Technologies) acoplado a un microscopio Olympus equipado con un filtro cube (Chroma Technology). Las células fueron iluminadas durante 100 ms a una longitud de onda de excitación de 490 nm con un monocromador (Polychrome IV; TILL Photonics), y las imágenes se obtuvieron cada 1 s. El monocromador y la cámara CCD se controlaron y sincronizaron usando el software ImagingWorkbench (INDEC-BioSystems). Las medidas cuantitativas de epifluorescencia se realizaron con los softwares *ImageJ*. Los valores de fluorescencia fueron obtenidos del soma de los astrocitos y expresados como el porcentaje de $\Delta F/F_0$: $\Delta F/F_0 = 100 \times (F - F_0) / F_0$, donde F_0 es el promedio de fluorescencia obtenido en 5 – 10 secuencias cuando la célula se encuentra en reposo, y F es la fluorescencia a diferentes tiempos durante la actividad. A la señal de fluorescencia se le restó la señal del fondo como corrector de autofluorescencia o señales inespecíficas derivadas de otros elementos diversos a astrocitos.

La señal de calcio en los astrocitos se cuantificó como la frecuencia de ocurrencia de una espiga de calcio (número de elevaciones de calcio en control y durante la exposición a IGF-I registradas en los astrocitos del campo visual).

10. Fármacos y reactivos utilizados

Factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I) fue adquirido a Peprtech (Londres, Reino Unido). NVP-AEW541 fue adquirido a Cayman Chemical (Michigan, USA). D-(-)-2-Amino-5-phosphonopentanoic acid (D-AP5), (S)-(+)- α -Amino-4-carboxy-2-methylbenzeneacetic acid (LY-367385), 2-Methyl-6-(phenylethynyl) pyridine hydrochloride (MPEP), 8 cyclopentyltheophylline (CPT), 2-(2-Furanyl)-7-(2-phenylethyl)-7H-pyrazolo[4,3-e][1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidin-5-amine (SCH 58261) y Sulforhodamine 101 fueron adquiridos a Tocris (Bristol, Reino Unido). BAPTA tetrapotassium salt fue adquirido a Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Alemania). El indicador de calcio

Fluo4-AM fue adquirido a Molecular Probes (Eugene, EE.UU.). El resto de reactivos y fármacos fueron adquiridos a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

11. Análisis estadístico de los datos

Los datos fueron analizados usando el programa informático pClamp (Molecular Devices) y las herramientas estadísticas del programa Excel (Microsoft Office 2003). Las respuestas electrofisiológicas in vitro fueron promediadas cada 20 estímulos para las PSC y cada 12 para los PSP. Las magnitudes de los cambios de las PSC y los PSP fueron expresadas como la proporción (%) de la amplitud respecto a la línea base control, y graficados en función del tiempo con el programa SigmaPlot 11.0.

El origen presináptico o postsináptico fue comprobado mediante la relación de la amplitud de las respuestas evocadas por pulsos pareados (PPR del inglés *paired pulse ratio*; $R2/R1$), con pulsos separados 50 ms, donde $R1$ y $R2$ son las amplitudes de los picos de las corrientes postsinápticas del primer y segundo pulso respectivamente. Para estimar la variación de las corrientes sinápticas se calculó el coeficiente de variación ($1/CVR^2$). Para ello primero se calculó el coeficiente de variación del ruido libre (CVNF) para las respuestas sinápticas en control y tras 30 minutos de la inducción de la plasticidad ($CVNF = \sqrt{(\delta PSC^2 - \delta noise^2) / m}$; donde $\delta PSC^2 - \delta noise^2$ son la variación del pico del PSC y la línea base respectivamente y m es la media de la amplitud del pico del PSC). La ratio del CV medido antes y 30 minutos después del protocolo de inducción (CVR) fue obtenido para cada célula como CV post-protocolo de inducción/CV control (Clements, 1990). Finalmente, se construyó un gráfico comparando la variación en Mr (30 minutos tras el protocolo de inducción sobre m en condición control) frente a los cambios en la varianza de respuesta de la amplitud del PSC ($1/CVR^2$) en cada célula.

Para comparar las sl_{AHP} de los distintos grupos animales de comportamiento (salino, IGF-I y NVP-AEW541+IGF-I) se aplicó el test ANOVA con un *post hoc* de Tukey para comparaciones múltiples.

Los datos se expresaron como el promedio \pm el error estándar de la media (SEM) indicándose en cada caso el número de datos (n). Los datos se analizaron utilizando el

test paramétrico t de Student. Las diferencias significativas se representaron de la siguiente manera: $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), and $p < 0.001$ (***)).

IV. RESULTADOS

El factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I) es un factor trófico que juega un papel importante en fenómenos de plasticidad tanto sináptica como intrínseca (Kar et al., 1997; Carro et al., 2000; Seto et al., 2002; Ramsey, 2005; Molina et al., 2012; Mysoet et al., 2015). Adicionalmente, sus niveles pueden variar en el sistema nervioso central ya que no sólo es sintetizado por las neuronas (Carro, 2005; Nishijima et al., 2010), sino que de manera periférica entra a través de los plexos coroideos y también atraviesa la barrera hematoencefálica de manera dependiente de actividad. Los aumentos en los niveles de IGF-I en la corteza de barriles generan un aumento de actividad y una desincronización del ECG en ratas anestesiadas. Sin embargo, no se ha demostrado que IGF-I pueda estar aumentando la excitabilidad de las neuronas piramidales de capa 2/3 de esta corteza. Así pues, investigamos si los aumentos en los niveles de IGF-I producen incrementos en la resistencia de membrana y en la excitabilidad neuronal.

1. IGF-I induce aumentos en la resistencia de membrana y en la excitabilidad neuronal en capa 2/3.

Para analizar los cambios en la resistencia de la membrana (R_m) de las neuronas piramidales de capa 2/3 de la corteza de barriles del ratón (Fig. 9 A) inducidos por IGF-I, se midieron en *current-clamp* los cambios en el potencial de membrana inducidos por aplicación de pulsos de corriente hiperpolarizantes y despolarizantes a través de la pipeta de registro antes (control) y durante IGF-I (10 nM a los 30 min), (Ver materiales y métodos) (Fig. 9B flechas negras). Como se puede observar en la gráfica en la que se representa la amplitud de la respuesta a cada pulso de corriente (gráfica de la relación corriente-voltaje ó I-V), los valores en control (puntos negros) se ajustan a una recta con pendiente menor que la correspondiente a los valores obtenidos en presencia de IGF-I. Por tanto, y teniendo en cuenta la ley de Ohm donde la pendiente de la recta en la gráfica I-V es igual a la resistencia de membrana, deducimos que IGF-I indujo un aumento en la resistencia de la membrana (R_m de 136.37 ± 13.97 a 205.37 ± 16.31 M Ω , medidas como la pendiente de la relación corriente-voltaje; $n=14$, $p<0.01$; Figura 9D).

Además, se cuantificó el número de potenciales de acción (PAs) para el mismo pulso de corriente aplicado tanto en control como durante IGF-I (Fig. 9B), observándose que IGF-I inducía un aumento en el número de PAs (de 4.37 ± 0.78 a 7.50 ± 0.75 Hz, $n=14$, $p<0.01$; Figura 9C). Tomando en cuenta los resultados anteriores podemos concluir que IGF-I aumenta la excitabilidad de las neuronas de capa 2/3 al incrementar tanto el número de PAs generados mediante pulsos de corriente despolarizantes y como la R_m .

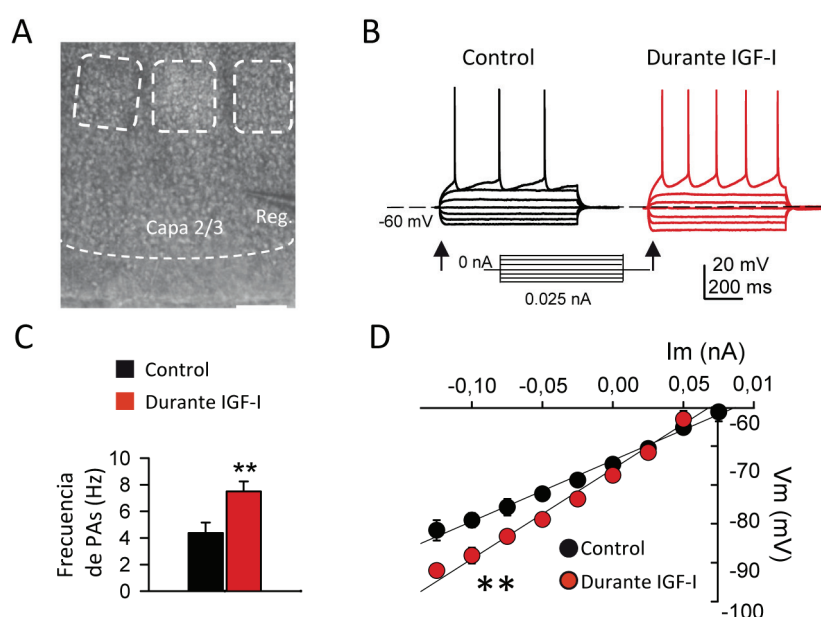


Figura 9. IGF-I induce un incremento de la excitabilidad en neuronas piramidales de la capa 2/3 de la corteza de barriles. (A) Imagen de una rodaja seccionada coronalmente en la que se muestra la capa 1, 2/3 y 4 de la corteza de barriles junto con la localización del electrodo de registro (Reg.). (B) Trazos representativos de la relación de corriente-voltaje I-V en control (trazos negros) y durante la perfusión de IGF-I (trazos rojos) en la que se puede apreciar el aumento del número de PAs en el mismo pulso de corriente aplicado. (C) Cuantificación del número de PAs en control (barra negra) y durante la aplicación de IGF-I (barra roja). (D) Promedio de la relación corriente-voltaje en control y durante IGF-I (flechas negras en B) y ajustadas a una regresión lineal en la que se analizó la pendiente de la recta.

Dado que los aumentos de actividad cortical inducidos por IGF-I en el ECG podrían ser, además, debidos a un aumento de la eficacia de la transmisión sináptica, analizamos si IGF-I estaría aumentando la transmisión sináptica en neuronas de capa 2/3.

2. IGF-I modula la transmisión sináptica.

Para estudiar la modulación de la transmisión sináptica por IGF-I, en el modo de *voltage-clamp* (VC), usamos una solución intracelular que contenía gluconato de cesio y llevamos a cabo los registros de las EPSC e IPSC a -60 mV y 0 mV, respectivamente (ver materiales y métodos, Fig. 6). Tras un registro estable de las corrientes sinápticas, se cambió al modo de *current-clamp* (CC) y se aumentó la intensidad de estimulación hasta inducir respuestas supraumbrales evocadas por la estimulación sináptica y se registraron durante cinco minutos. Durante ese tiempo $\approx 13\%$ de las respuestas fueron supraumbrales (8 ± 2.57 PA, $n=8$) mientras que el resto eran PSP (11.49 ± 2.11 mV, $n=8$). Después se aplicó IGF-I durante 35 minutos. En los primeros 15 minutos IGF-I aumentó el número de respuestas supraumbrales (37 ± 3.76 % respecto del control, $n=8$, $p<0.01$; Fig. 10B). A continuación, se volvió al modo de VC con los mismos parámetros de estimulación que en condiciones control y se registraron las EPSC y las IPSC durante 20 minutos, observando que las EPSC habían sido potenciadas (31.02 ± 5.51 % respecto del control, $n=8$, $p<0.001$; Fig. 10A abajo, círculos negros) y que las IPSC habían sido deprimidas (45.09 ± 5.31 % respecto a su control, $n=8$, $p<0.001$; Fig. 10A abajo, círculos blancos). Finalmente se cambió a la solución extracelular sin el IGF-I y pudimos observar que mientras que las IPSC se mantenían deprimidas durante todo el experimento, las amplitudes de las EPSC regresaban a valores basales a los 15 minutos de lavado del IGF-I (fig. 10A). Por tanto, nuestros resultados demuestran que IGF-I induce una LTD de las IPSC y una STP de las EPSC.

Del mismo modo, se realizaron experimentos similares pero esta vez en presencia de NVP-AEW541 en el baño, un antagonista del IGF-IR. NVP-AEW541 evitó la modulación inducida por IGF-I tanto de las EPSC ($n=5$, $p=0.26$; Fig. 10A abajo, triángulos negros) como de las IPSC ($n=5$, $p=0.58$; Fig. 10A abajo, triángulos blancos), así como el aumento de los PA (de 4.4 ± 2.31 a 5.2 ± 3.55 número de PA en control y tras 10 minutos con IGF-I medidos durante 5 minutos, $n=5$, $p=0.85$; Fig. 10B abajo).

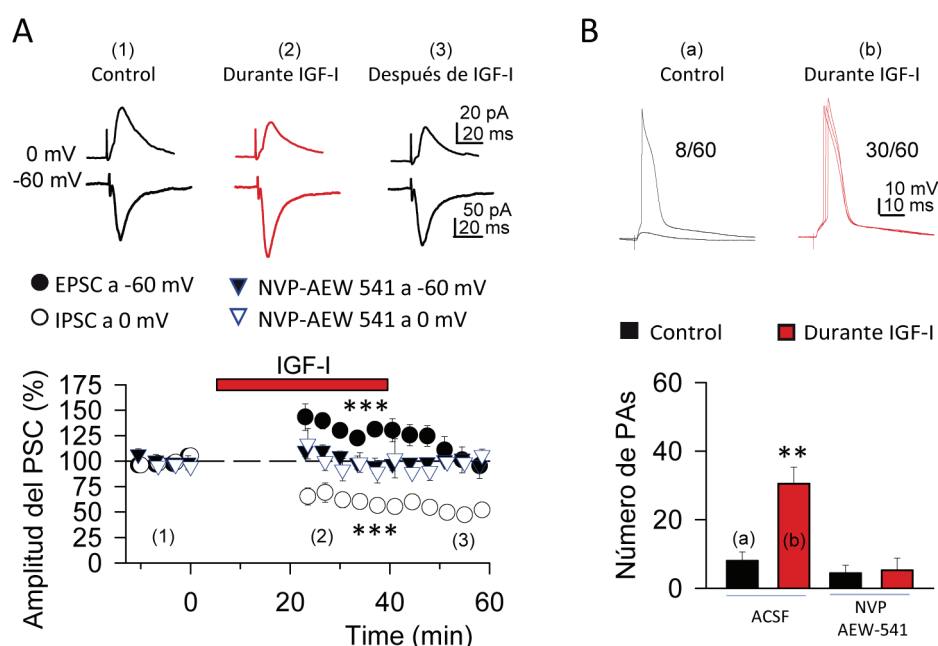


Figura 10. IGF-I induce una STP de la EPSC y una LTD de la IPSC. (A, arriba) Trazos representativos de EPSCs registradas a -60 mV (trazos superiores) e IPSCs registradas a 0 mV (trazos inferiores) en control (1), durante IGF-I (2) y tras el lavado de éste (3). **(A, abajo)** Curso temporal de la PSC registrado a -60 mV (EPSC) y de la PSC registrado a 0 mV (IPSC), en ACSF y en presencia de NVP-AEW541 antes y después de la aplicación de IGF-I. **(B, arriba)** Trazos representativos de PSPs y PAs registrados en CC en control (trazos negros) y durante IGF-I (trazos rojos). **(B, abajo)** Número de PAs registrados en ACSF o en NVP-AEW541 en control (durante 5 minutos) y a los 10 minutos de perfusión de IGF-I (durante 5 minutos), en CC.

También realizamos algunos experimentos controles para validar el protocolo empleado para obtener los registros y mostrar que cuando no añadíamos IGF-I no se producían cambios ni en las EPSC ni en las IPSC ($n=5$, $p=0.65$ y $p=0.1$ EPSC e IPSC respectivamente; Fig. 11A abajo) así como tampoco en el número de respuestas supraumbrales (de 5.8 ± 3.63 a 4.6 ± 1.93 número de PA durante los primeros 5 minutos y durante los últimos 5 minutos en CC, $n=5$, $p=0.77$).

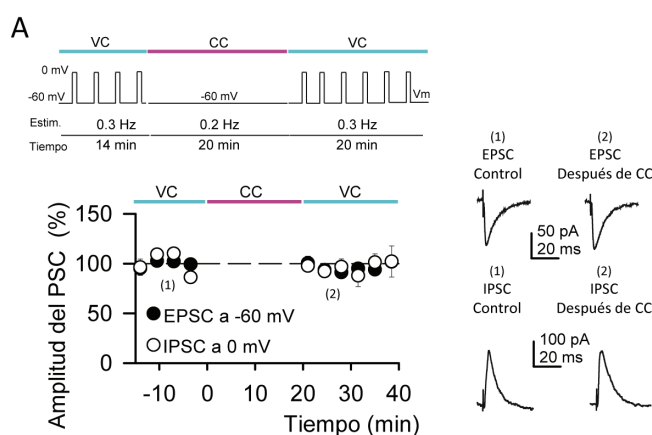


Figura 11. El protocolo de aislamiento de las EPSC e IPSCs no produce cambios en la eficacia sináptica. (A, Arriba) Protocolo utilizado para el aislamiento de la EPSC y de la IPSC. **(A, Abajo)** Curso temporal de la EPSC (círculos negros) y de la IPSC (círculos blancos) en VC.

3. La STP de las EPSC inducida por IGF-I se convierte en una LTD al prevenir los aumentos de calcio citosólico en la neurona postsináptica.

A continuación, analizamos si la STP de las EPSC inducida por IGF-I dependía de los aumentos en la concentración de calcio citosólico de la neurona postsináptica. En primer lugar, monitorizamos los niveles de calcio postsináptico con Fluo4, un indicador de calcio fluorescente. IGF-I produjo incrementos en los niveles de calcio citosólico postsinápticos medidos durante los primeros 15 minutos (de 127.41 ± 12.82 a 175.44 ± 11.44 % durante un PA en LCA y con IGF-I respectivamente, $n=8$, $p<0.05$, Fig. 12A y C) que fueron prevenidos en presencia de NVP-AEW541 ($n=5$, $p=0.97$; Fig. 12B y C). A continuación, se evitaron los aumentos de calcio postsináptico usando BAPTA, un quelante de calcio, en la pipeta de registro. En esta condición, aunque IGF-I aumentó en el número de PA (de 4.00 ± 1.48 a 24.16 ± 7.50 número de PAs antes y durante IGF-I respectivamente, $n=6$, $p<0.05$) no indujo aumentos en los niveles de calcio en las neuronas registradas ($n=6$, $p=0.73$; Fig. 12C), ni STP de las EPSC, sino una depresión a largo plazo de las EPSC (LTD de las EPSC) (de 97.03 ± 2.82 a 42.53 ± 4.91 % en control y durante IGF-I respectivamente, $n=6$, $p<0.001$; Fig. 12D, círculos verdes). En presencia de NVP-AEW541, la LTD de la EPSC fue abolida ($n=5$, $p=0.63$; Fig. 12D, triángulos grises) indicando que esta forma de plasticidad sináptica inducida por IGF-I también dependía de la activación de los IGF-IR.

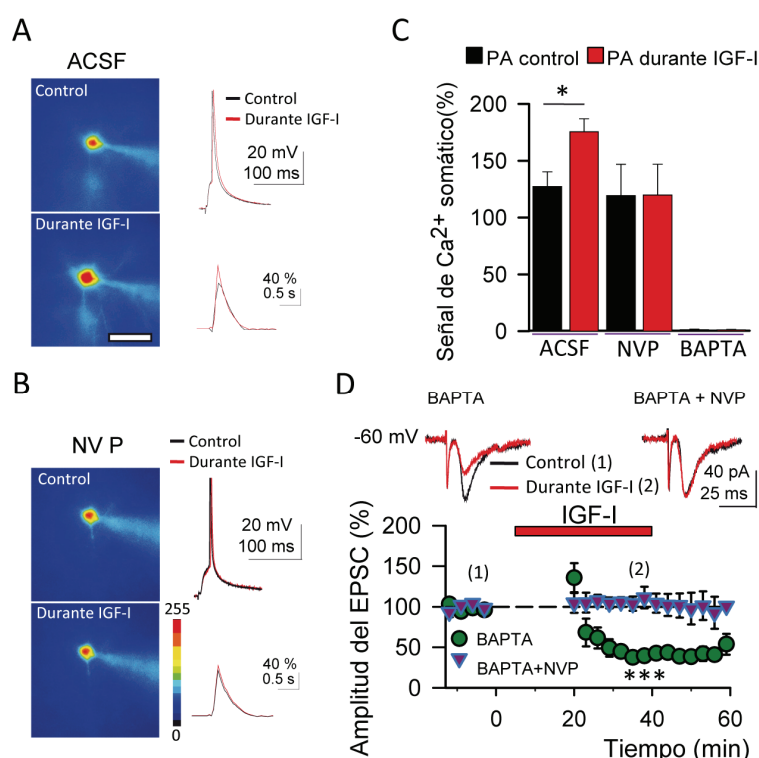


Figura 12. IGF-I induce una LTD de la EPSC en BAPTA postsináptico. (A, izquierda) Imágenes de pseudocolor de los niveles de fluorescencia que muestran los aumentos de calcio citosólico en una neurona piramidal de capa 2/3 de la corteza de barriles durante un PA en control (arriba) y durante IGF-I (abajo). Barra de escala 50 μ m. (A, derecha) Trazos que muestran los potenciales de acción (arriba) generados en control (trazo negro) y durante IGF-I (trazo rojo), y los trazos representativos de las señales de calcio relativas a los PAs (abajo) en control (trazo negro) y durante IGF-I (trazo rojo). (B, izquierda) Igual que en A, izquierda, pero en NVP-AEW541. (B, derecha) Igual que en A, derecha, pero en NVP-AEW541. (C) Promedio del pico de amplitud de los aumentos de calcio somático en ACSF, NVP-AEW541 y BAPTA, durante un PA en control (barra negra) y durante IGF-I (barra roja). (D, arriba) Trazos representativos de EPSCs con BAPTA (izquierda) y BAPTA más NVP-AEW541 (derecha) en control (trazos negros) y durante IGF-I (trazos rojos). (D, abajo) Curso temporal de la EPSC registrado en BAPTA (círculos verdes) y en BAPTA+NVP-AEW541 (triángulos morados con contorno azul) antes, durante y después de la aplicación de IGF-I.

Por tanto, la STP de las EPSC depende de los aumentos en la concentración de calcio postsináptica inducidos por la activación de los IGF-IR. Cuando estos aumentos no se producen aparece una LTD de las EPSC que también es dependiente de la activación de los IGF-IR.

Para confirmar estos resultados llevamos a cabo un protocolo de registro en modo VC sin cambiar al modo CC, de tal manera que la célula registrada no generara PAs y por tanto los aumentos de calcio asociados a estos. Tras un registro control de las EPSC a -60 mV, añadimos IGF-I en el baño y observamos que no se producían aumentos en

los niveles de calcio postsinápticos ($n=6$, $p=0.19$; Fig. 13A). Sin embargo, al igual que observábamos en la condición donde incluíamos BAPTA en la solución intracelular, IGF-I indujo la LTD de las EPSC (de 99.59 ± 0.44 a 67.36 ± 3.87 % antes y durante IGF-I respectivamente, $n=6$, $p<0.001$; Fig. 13B, círculos negros). Además, este efecto fue dependiente de la activación de los IGF-IR debido a que en presencia del NVP-AEW541 la LTD fue abolida ($n=5$, $p=0.21$; Fig. 13B, triángulos negros).

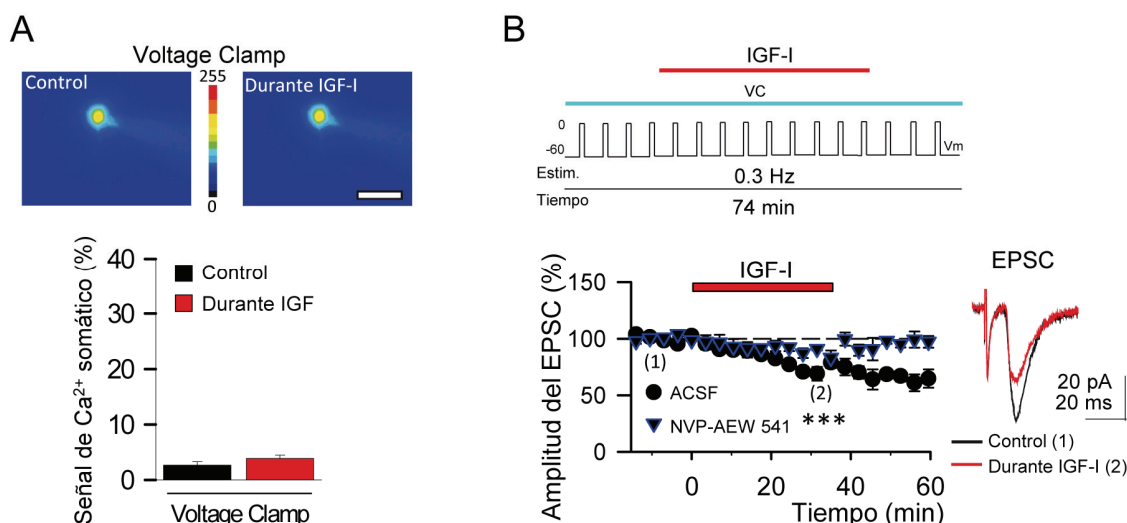


Figura 13. IGF-I induce LTD de la EPSC cuando la neurona postsináptica se mantiene en voltage-clamp durante todo el experimento. (A, arriba) Imágenes de pseudocolor de los niveles de fluorescencia que muestran la ausencia de aumentos de calcio citosólico postsinápticos en una neurona piramidal de capa 2/3 de la corteza de barriles en control (izquierda) y durante IGF-I (derecha) registrada en voltage-clamp. Barra de escala 50 μ m. **(A, abajo)** Promedio del pico de amplitud de los aumentos de calcio somático en control (barra negra) y durante IGF-I (barra roja), en una neurona registrada en voltage-clamp. **(B, arriba)** Protocolo utilizado para la EPSC en modo de voltage-clamp. **(B, abajo)** Curso temporal de la EPSC registrado en ACSF (círculos negros) y en NVP-AEW541 (triángulos negros con contorno azul) antes, durante y después de la aplicación de IGF-I en la configuración de voltage-clamp. Derecha, Trazos representativos de EPSCs en control (trazo negro) y durante IGF-I (trazo rojo).

Nuevamente, para validar el protocolo utilizado para obtener los registros realizamos los mismos experimentos, pero sin perfundir IGF-I. En estos casos no se produjeron cambios en la eficacia sináptica derivadas del protocolo per sé ($n=5$, EPSC $p=0.65$ e IPSC $p=0.09$ respectivamente; Fig. 14, círculos negros para EPSC y blancos para IPSC) indicando que la plasticidad sináptica en los experimentos anteriores era inducida por el IGF-I y no por los cambios de potencial de membrana entre -60 y 0 mV.

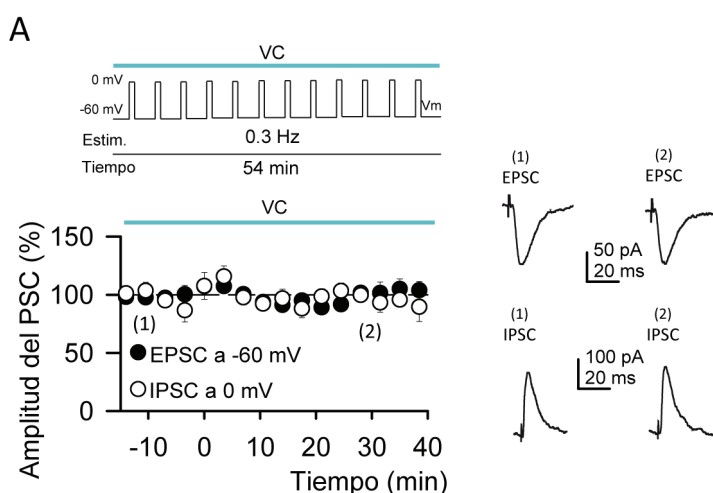


Figura 14. El protocolo de aislamiento de la EPSC e IPSC en voltage-clamp no produce cambios en la eficacia sináptica. (A, Arriba) Protocolo utilizado para el aislamiento de la EPSC y de la IPSC. **(A, Abajo)** Curso temporal de la PSC registrado a -60 mV (EPSC, círculos negros) y a 0 mV (IPSC, círculos blancos) en VC.

Por tanto, en base a nuestros resultados podemos resumir que el IGF-I produce un incremento de la R_m y de la excitabilidad e induce plasticidad sináptica tanto de la transmisión sináptica excitadora como de la inhibitoria (LTD de las IPSC). Además, la modulación de la transmisión sináptica excitadora es dual ya que se induce la STP de las EPSC cuando en la neurona postsináptica ocurren aumentos en los niveles de calcio citosólico o LTD de las EPSC cuando estos son evitados.

4. La STP de las EPSC no se debe a cambios en la probabilidad de liberación de glutamato.

A continuación, quisimos estudiar si la STP de las EPSC era debida a cambios en la Pr de neurotransmisor, en presencia de picrotoxina (PiTX), un inhibidor de los receptores de $GABA_A$. Para ello analizamos la relación de las respuestas evocadas por pulsos pareados (PPR), definida como $(PPR=R2/R1)$ la división de la amplitud de la segunda respuesta (R2) entre la amplitud de la primera (R1). Durante la STP de las EPSC inducida por IGF-I no se produjeron cambios significativos en la PPR respecto al control ($n=6$, $p=0.67$; Fig. 15A) indicando que esta plasticidad sináptica no estaba mediada por cambios en la probabilidad de liberación. Además, se estudió el coeficiente de variación (CV) y la amplitud media de las EPSC (m) y se obtuvo el CV^2_r y la Mr dividiendo los valores observados durante IGF-I respecto al control ($CV^2_r=CV^2_{IGF-I}/CV^2_{control}$, $Mr= m_{IGF-I}/m_{control}$). Al representar el $1/CV^2_r$ respecto a Mr ,

observamos que el aumento en Mr no se relacionaba con cambios en $1/CV^2r$ (correlación lineal $R^2=0.0283$, $n=6$; Fig. 15B) confirmado la ausencia de cambios en Pr y apoyando un origen postsináptico en la STP de las EPSC.

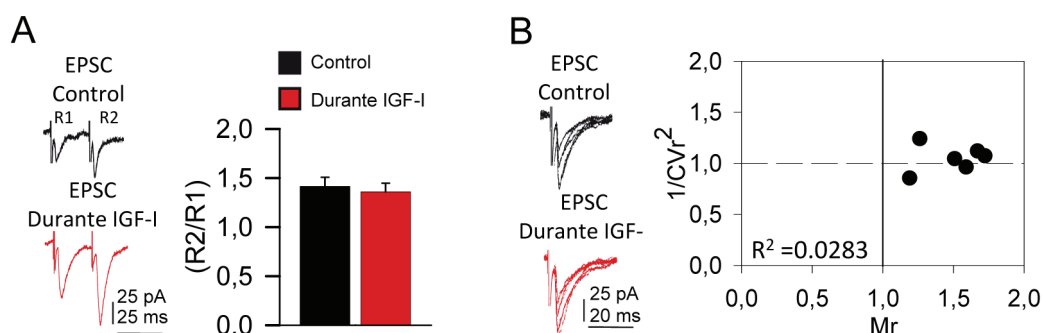


Figura 15. La STP de la EPSC mediada por IGF-I no es debida a un incremento en la probabilidad de liberación de glutamato. (B, izquierda) Trazos representativos de las respuestas evocadas por pares de pulsos separados por 50 ms antes y durante la aplicación de IGF-I (trazos negros y rojos respectivamente). **(B, derecha)** Representación gráfica de la PPR ($R2/R1$) en la que se muestra la relación del segundo pulso (R2) respecto del primero (R1) antes y durante la perfusión de IGF-I (barras negra y roja respectivamente). Nótese que no hay diferencias significativas entre ambas. **(C, izquierda)** Trazos representativos de la variabilidad de los EPSCs antes (trazo rojo) y durante IGF-I. **(C, derecha)** Representación gráfica de la varianza ($1/CV^2r$) con respecto a la media de la amplitud del pico de las EPSCs normalizadas respecto al control (M) medida \approx a los 15 minutos de la aplicación de IGF-I. Nótese que los puntos no siguen una diagonal lo que indica un origen postsináptico de la potenciación mediada por IGF-I.

Asimismo, estudiamos la LTD de la EPSC inducida por IGF-I en presencia de picrotoxina (PiTX), cuando la neurona postsináptica se registra en VC durante todo el experimento. En estas condiciones, IGF-I seguía induciendo la LTD de las EPSC evocadas por pulsos pareados (de 99.46 ± 0.33 a 45.52 ± 9.22 % antes y durante IGF-I, $n=5$, $p<0.01$; Fig. 16A), observándose un aumento en la PPR (de 0.98 ± 0.01 a 1.28 ± 0.10 en control y con IGF-I, $n=5$, $p<0.05$; Fig. 16B) que sugiere una disminución en la Pr. Este origen presináptico en la LTD de las EPSC mediada por IGF-I fue confirmado por la relación entre la disminución de Mr y el cambio en $1/CV^2r$ (correlación lineal $R^2=0.974$, $n=5$; Fig. 16B).

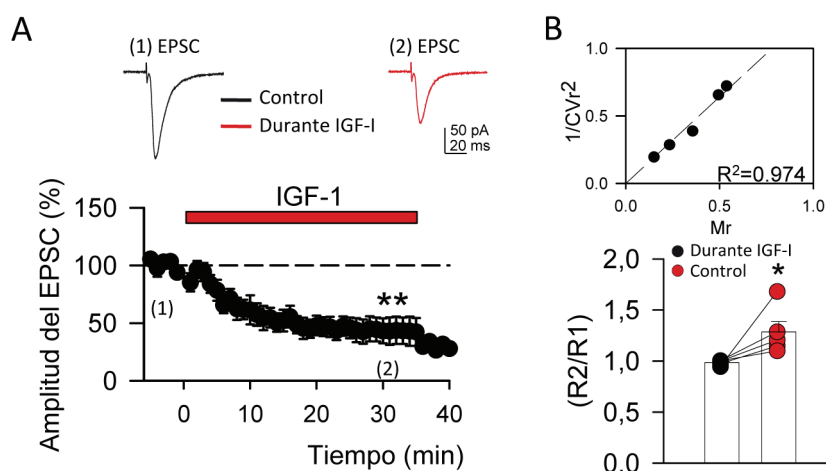


Figura 16. La LTD de la EPSC mediada por IGF-I va acompañada de una disminución de la probabilidad de liberación de glutamato. (A, arriba) Trazos representativos de las EPSCs antes y durante la aplicación de IGF-I (trazos negro y rojo respectivamente). **(A, abajo)** Curso temporal de la EPSC registrado en VC (abajo) en el que la aplicación de IGF-I produce una LTD. **(B, arriba)** Representación gráfica de la varianza ($1/CVr^2$) con respecto a la media de la amplitud del pico de las EPSCs normalizada respecto al control (M) medida \approx a los 15 minutos de la aplicación de IGF-I. Nótese que los puntos siguen una diagonal lo que indica un origen presináptico de la depresión mediada por IGF-I. **(B, abajo)** Representación gráfica de la PPR ($R2/R1$) en la que se muestra la relación del segundo pulso ($R2$) respecto del primero ($R1$) antes y durante la perfusión de IGF-I (barras negra y roja respectivamente). Nótese que la diferencia significativa entre ambas.

Debido a la implicación del NMDAR en la inducción de plasticidad sináptica, y dado que la STP de la EPSC depende de aumentos de calcio postsináptico, quisimos estudiar si esta plasticidad sináptica era dependiente de este receptor. Para ello, hicimos experimentos similares a los del a figura 10 pero en presencia de D-AP5, un antagonista de los NMDAR. En D-AP5, IGF-I también inducía una STP de las EPSC (de 97.16 ± 3.23 a 151.86 ± 13.53 , $n=5$, $p<0.05$; Fig. 17A, círculos rosas) por lo que esta plasticidad sináptica es independiente de la activación de los NMDAR.

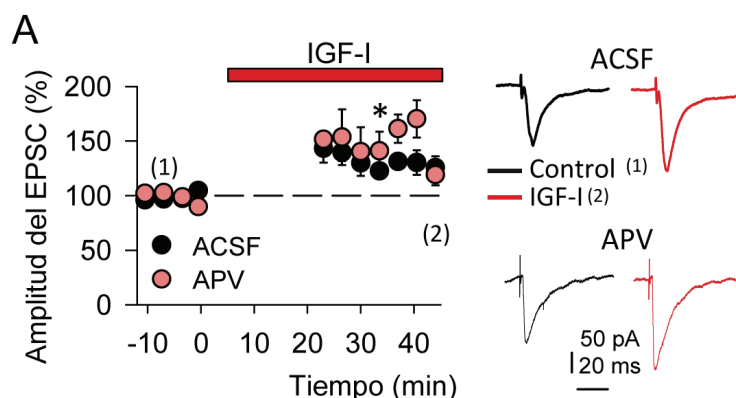


Figura 17. La STP de la EPSC mediada por IGF-I es independiente de la activación del receptor NMDA. (A, izquierda) Curso temporal de las EPSCs registradas en ACSF (círculos negros) y en APV (círculos marrones), antes y durante la aplicación del IGF-I en el baño. Nótese la ausencia de diferencias significativas en la modulación de la EPSC por IGF-I en presencia de APV respecto a ACSF. (A, derecha) Trazos representativos de las EPSCs en control y durante IGF-I (trazos negro y rojo) en ACSF (arriba) y en APV (abajo).

Por tanto, la STP de la EPSC inducida por IGF-I es dependiente de aumentos de calcio citosólico postsinápticos e independiente tanto de la activación de los NMDAR como de los cambios en la Pr.

5. La plasticidad de las EPSC inducida por IGF-I requiere la actividad astrocitaria

Dado que existen numerosas formas de plasticidad sináptica que requieren la participación de los astrocitos y que estos poseen receptores de IGF-I (Komoly et al., 1992), quisimos comprobar si la plasticidad sináptica inducida por IGF-I dependía de los astrocitos.

Como primera aproximación para responder a esta pregunta, procedimos a evitar los aumentos de calcio en astrocitos cercanos a la neurona piramidal que posteriormente iba ser registrada. Para esto, registramos un astrocito utilizando una solución intracelular que contenía BAPTA. Se sabe que el BAPTA tiene capacidad de difundir por las *gap-junction* y evita los aumentos de calcio en toda la red astrocitaria asociada a ese astrocito impidiendo así la inducción de plasticidad sináptica dependiente de los astrocitos (Jourdain et al., 2007; Shigetomi et al., 2008). Tras una diálisis ≥ 30 minutos para permitir la completa difusión del BAPTA por la red astrocitaria, comprobamos la disminución en la frecuencia de los aumentos de calcio

espontáneos (de 1.19 ± 0.14 a $0.24 \pm 0.08 \text{ min}^{-1}$ antes y tras 30 minutos con BAPTA intracelular, $n=24$, $p<0.001$; Fig. 18A). Posteriormente, llevamos a cabo experimentos similares a los de la figura 10 en neuronas relativamente cercanas al astrocito registrado ($\leq 100 \mu\text{m}$ de distancia). En estas condiciones, IGF-I no indujo ni cambios en el número de respuestas supraumbrales ($n= 5$, $p= 0.91$) ni en la amplitud de las EPSCs ($n=5$, $p=0.14$; Fig. 18B) indicando que los aumentos en los niveles de calcio citosólico en los astrocitos son requeridos en ambos fenómenos.

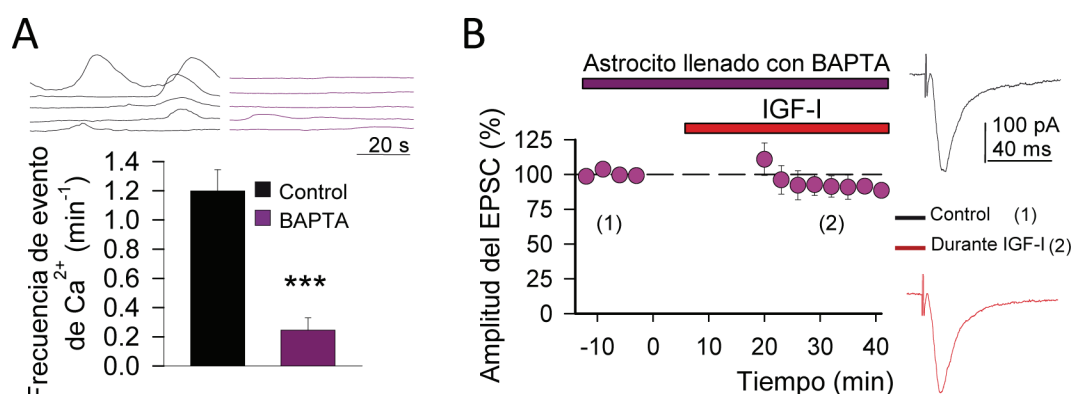


Figura 18. El bloqueo de los aumentos de calcio en los astrocitos con BAPTA impide la modulación de las EPSCs por IGF-I en neuronas adyacentes. (A, arriba) Trazos representativos de aumentos de calcio en control (trazos negros) y 30 minutos tras la perfusión de BAPTA en la pipeta durante el registro de un astrocito (trazos morados). **(A, abajo)** Gráfico de barras de la frecuencia de aumentos de calcio somático astrocitarios en control y 30 minutos tras la perfusión de BAPTA en la pipeta durante el registro de un astrocito (barras negra y morada respectivamente). **(B, izquierda)** Curso temporal de la EPSC en ACSF tras 30-60 minutos de registro de un astrocito con BAPTA (40 mM) antes y durante la aplicación del IGF-I en el baño. **(B, derecha)** Trazos representativos de las EPSCs en control (negro) y durante IGF-I (rojo).

Los astrocitos pueden liberar glutamato como gliotransmisor que activando a los receptores metabotrópicos del glutamato de tipo I, el mGluR1 y el mGluR5 inducen distintas formas de plasticidad sináptica. Dado que la plasticidad sináptica inducida por IGF-I depende de la activación astrocitaria, a continuación, analizamos si dependía de la activación de los mGluR1 y el mGluR5. Bloqueando los mGluR1 y el mGluR5 con LY367385 (100 μM) y MPEP (50 μM) respectivamente, observamos que el IGF-I no inducía STP de las EPSC sino LTD de las EPSC (de 99.80 ± 1.28 a $77.36 \pm 6.24 \%$ en control y durante IGF-I, $n=8$, $p<0.01$; Fig. 19A) indicando que la activación de estos

receptores es necesaria para la STP de las EPSC y sugiriendo que el astrocito podría estar liberando glutamato.

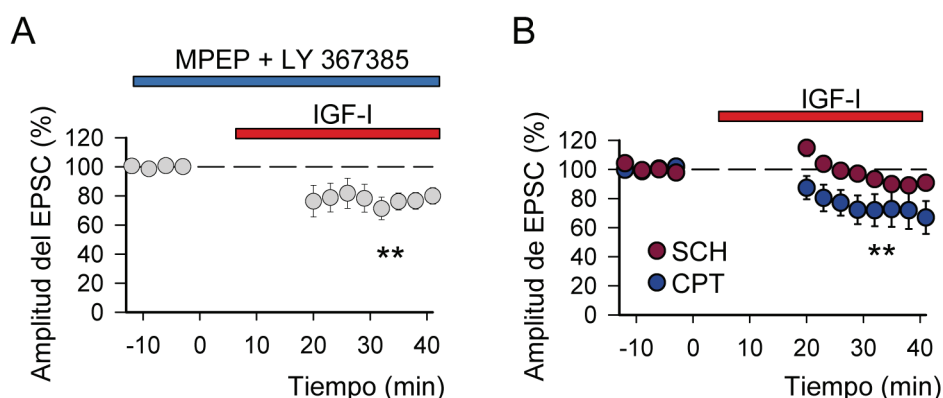


Figura 19. La activación de los receptores mGluRs (1 y 5) y los receptores de adenosina (A_{2A} y A_1) son necesarias para la STP de la EPSC, pero solo la activación del receptor A_{2A} es requerida para la LTD generada por IGF-I. **(A)** Curso temporal de la EPSC registrado en presencia de MPEP+LY 367385 (antagonistas de los mGluRs 1 y 5, respectivamente), antes y después de la aplicación de IGF-I. **(B)** Curso temporal de la EPSC registrado en presencia de SCH58261 o CPT (antagonistas de los A_{2A} y A_1 , respectivamente), antes y después de la aplicación de IGF-I.

De igual modo, estudiamos si la activación de los receptores de adenosina es necesaria en la plasticidad sináptica inducida por IGF-I debido a que el astrocito puede liberar ATP como gliotransmisor, el cual es degradado rápidamente a adenosina. Para ello, utilizamos antagonistas para los receptores A_1 y A_{2A} de adenosina, el CPT (5 μ M) y SCH58261 (100 nM) respectivamente. Aunque ambos antagonistas previnieron la STP de las EPSC, con SCH58261 no se observó ninguna modulación ($n=6$, $p=0.06$; Fig. 19B, círculos granates), mientras que con CPT IGF-I indujo la LTD de las EPSC (de 100.23 ± 0.23 a 70.27 ± 9.84 % para CPT, en control y durante IGF-I, $n=6$, $p<0.05$; Fig. 19B, círculos azules). Por tanto, estos resultados indican que la activación de los receptores de adenosina A_{2A} es necesaria para la modulación de la transmisión sináptica excitadora por IGF-I, requiriéndose además la activación de los A_1 y los mGluRs en la inducción de STP de las EPSC. Dado que la activación de los receptores de adenosina en diversas formas de plasticidad sináptica es debida al ATP liberado por los astrocitos que es convertido a adenosina que activa a los receptores A_1 y A_{2A} (Panatier et al., 2011; Martín et al., 2007; Martin-Fernandez et al., 2017), estos resultados sugieren

que los astrocitos podrían estar liberando ATP en la plasticidad sináptica inducida por IGF-I.

6. IGF-I induce una LTD de la transmisión sináptica inhibitoria

Si bien se acaba de mostrar que el IGF-I ejerce un papel importante en la modulación de la transmisión sináptica excitadora, también induce una LTD de la IPSC (figura 10). Para determinar si la LTD de la IPSC se debe a una disminución en la Pr, analizamos la PPR de las respuestas evocadas por pares de pulsos. El IGF-I indujo un aumento en la PPR (de 1.17 ± 0.04 a 1.45 ± 0.05 antes y durante IGF-I, $n=8$, $p<0.01$; Fig. 20A, barra blanca y roja respectivamente) indicando una disminución en la Pr y por tanto una expresión presináptica en esta LTD. Para comprobar este origen presináptico, analizamos la relación entre la disminución en Mr y el cambio en $1/CV^2r$ observándose una correlación lineal ($R^2=0.848$, $n=8$; Fig. 20B) lo que sugiere una disminución en la Pr y apoya por tanto una expresión presináptica en esta LTD.

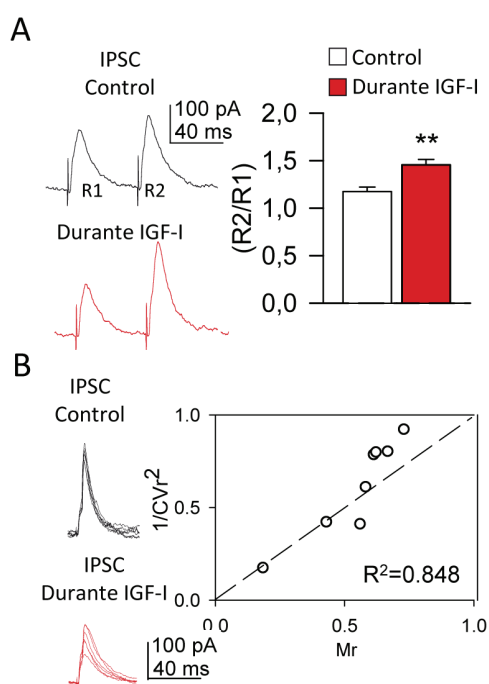


Figura 20. La LTD de la IPSC mediada por IGF-I es debida a una disminución en la probabilidad de liberación de GABA. (A, izquierda) Trazos representativos de las IPSCs evocadas por pares de pulsos separados por 50 ms antes y durante la aplicación de IGF-I (trazos negros y rojos respectivamente). **(A, derecha)** Representación gráfica de la PPR ($R2/R1$) en la que se muestra la relación del segundo pulso (R2) respecto del primero (R1) antes y durante la perfusión de IGF-I (barras blanca y roja respectivamente). **(B, izquierda)** Trazos representativos de la variabilidad de las IPSCs antes (trazo negro) y durante IGF-I (trazo rojo). **(B, derecha)** Representación gráfica de la varianza ($1/CV^2r$) con respecto a la media de la amplitud del pico de las IPSCs normalizada respecto al control (M) medida \approx a los 15 minutos de la aplicación de IGF-I. Nótese que los puntos siguen una diagonal lo que indica un origen presináptico de la depresión mediada por IGF-I.

Al igual que para la transmisión sináptica excitadora, comprobamos si la modulación de la transmisión inhibitoria también dependía de aumentos de calcio postsinápticos. Sin embargo, en este caso, la LTD de las IPSC inducida por IGF-I no requería de los aumentos de calcio en la neurona postsináptica ya que se seguía

induciendo cuando se registraba con BAPTA en la pipeta de registro (de 99.94 ± 2.01 a 46.42 ± 7.73 % antes y durante IGF-I, $n=6$, $p<0.001$; Fig. 21A, círculos verdes) o cuando todo el experimento se realizaba en VC (de 99.52 ± 1.92 a 59.77 ± 8.76 %, $n=6$, $p<0.01$; Fig. 21B, círculos blancos). Además, comprobamos que se requería la activación de los IGF-IR ya que NVP-AEW541 prevenía la inducción de la LTD de la IPSC ($n=5$, $p=0.35$; Fig. 21A, triángulos grises; $n=5$, $p=0.84$; Fig. 21B, triángulos blancos).

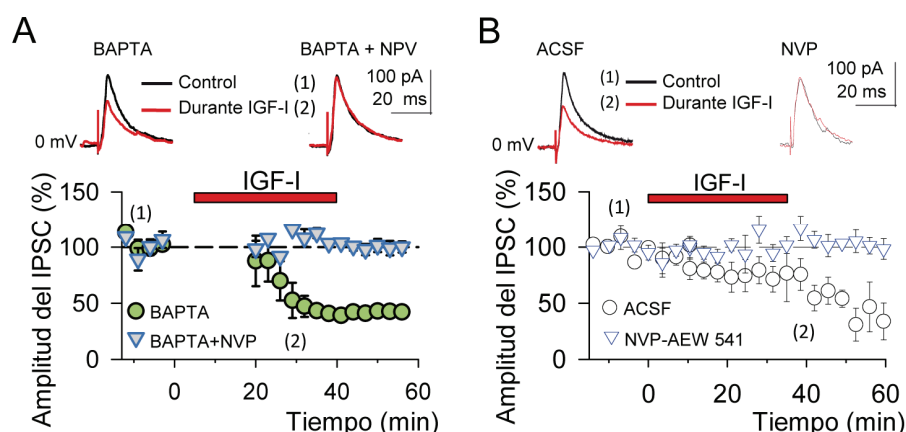


Figura 21. BAPTA postsináptico o registros en VC de la neurona postsináptica no previenen la LTD de la IPSC inducida por IGF-I. (A, arriba) Trazos representativos de las IPSCs con BAPTA (izquierda) y BAPTA más NVP-AEW541 (derecha) en control (trazos negros) y durante IGF-I (trazos rojos). (A, abajo) Curso temporal de las IPSCs registradas en BAPTA (círculos verdes) y en BAPTA+NVP-AEW541 (triángulos grises) antes y después de la aplicación de IGF-I. (B, arriba) Trazos representativos de las IPSCs en ACSF (izquierda) y en NVP-AEW541 (derecha) en control (trazos negros) y durante IGF-I (trazos rojos). (B, abajo) Curso temporal de las IPSCs registradas en ACSF (círculos negros) y en NVP-AEW541 (triángulos blancos) antes y después de la aplicación de IGF-I cuando se registra continuamente en modo voltage-clamp.

También verificamos que la LTD de la IPSC es independiente de la activación de los NMDAR porque estuvo presente cuando se usó D-AP5 (de 99.52 ± 0.47 a 72.91 ± 3.64 % antes y durante IGF-I, $n=5$, $p<0.01$; Fig. 22A, triángulos rosas).

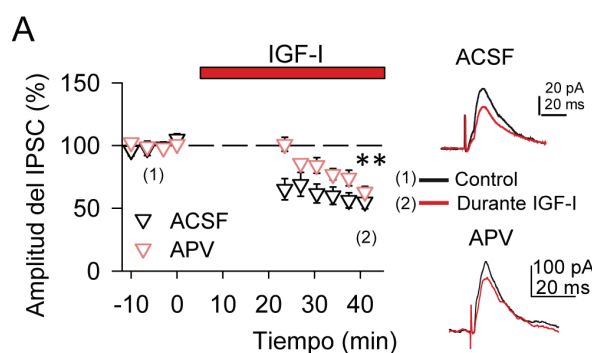


Figura 22. La LTD de la IPSC inducida por IGF-I es independiente de la activación del NMDAR. (A, izquierda) Curso temporal de las IPSC en ACSF (triángulos negros) y en D-AP5 (triángulos rojos), antes y durante aplicación de IGF-I. (A, derecha) Trazos representativos de las IPSC en ACSF (arriba) y en D-AP5 (abajo) en control (trazos negros) y durante IGF-I (trazos rojos).

Por tanto, nuestros resultados indican que el IGF-I induce una LTD de la IPSC independiente de las elevaciones de calcio postsináptico y de la activación de los NMDAR debido a una disminución a largo plazo en la Pr.

7. La LTD de las IPSC inducida por IGF-I requiere la actividad astrocitaria

A continuación, comprobamos si la LTD de las IPSC requería de los aumentos de calcio en la red astrocitaria. Como hicimos anteriormente, después de ≥ 30 minutos de registro de un astrocito con BAPTA en la solución intracelular, registramos una neurona cercana y tratamos de inducir la LTD de las IPSC con IGF-I. En este caso, al igual que para el de las EPSC, las corrientes inhibitoras no cambiaron, bloqueándose por tanto la LTD de las IPSC ($n=5$, $p=0.27$; Fig. 23A). Por tanto, el astrocito está participando de manera activa en la plasticidad sináptica del sistema gabaérgico y glutamatérgico mediada por IGF-I.

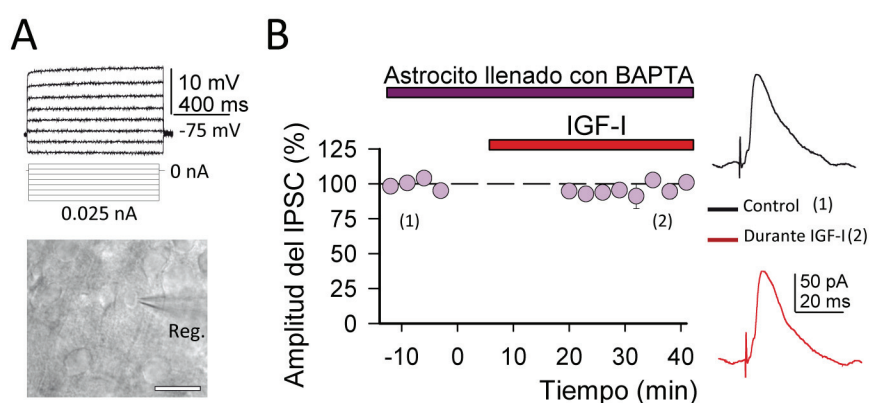


Figura 23. El bloqueo de los aumentos de calcio en los astrocitos con BAPTA impide la modulación de la IPSC por IGF-I en neuronas relativamente cercanas. (A, arriba) Trazos representativos de las respuestas en voltaje a la inyección de pulsos rectangulares de corriente (A arriba, inferior) de un astrocito **(A, abajo)** Imagen de una rodaja seccionada coronalmente en la que se muestra la pipeta de registro (reg.) sobre un astrocito. Barra de escala 50 μm . **(B, izquierda)** Curso temporal de las IPSCs en ACSF tras el registro de un astrocito con BAPTA (40 mM) durante 30-60 minutos, antes y durante la aplicación del IGF-I en el baño. **(B, derecha)** Trazos representativos de las IPSCs en control (trazo negro) y durante IGF-I (trazo rojo).

Al igual que hicimos para las EPSC, analizamos si el glutamato y el ATP podrían ser los gliotransmisores necesarios para la LTD de las IPSC. En presencia de LY367385 y MPEP, IGF-I seguía induciendo LTD de las IPSC (de 98.51 ± 1.63 a 85.72 ± 5.23 % antes y

durante IGF-I, $n=8$, $p<0.05$; Fig. 24A) pero de una menor magnitud que en condiciones control (45.09 ± 5.31 % de reducción en control y 19.62 ± 5.23 % de reducción en LY367385 y MPEP, $p<0.001$). Estos resultados sugieren que, aunque la activación de los mGluR no es necesaria para la inducción de LTD de las IPSC, estos facilitan una mayor depresión de la transmisión sináptica inhibitoria por IGF-I.

Curiosamente al antagonizar el receptor A_{2A} de adenosina con el SCH58261 no solo se previno la LTD, sino que se indujo una LTP de las IPSC mediada por IGF-I (de 100.12 ± 1.61 a 147.11 ± 13.37 % antes y durante IGF-I, $n=6$, $p<0.05$; Fig. 24B, círculos rosas). Sin embargo, en presencia del antagonista del receptor de adenosina A_1 , CPT, la LTD de la IPSC (de 98.77 ± 1.04 a 51.70 ± 8.11 % antes y durante IGF-I, $n=6$, $p<0.01$; Fig. 24B, círculos azules) no se vio afectada (45.09 ± 5.31 % de reducción en control y 48.30 ± 8.11 % de reducción en CPT, $p=0.055$), lo que nos confirma que la LTD de las IPSC necesita la activación del receptor A_{2A} de adenosina y se facilita por la activación de los mGluR.

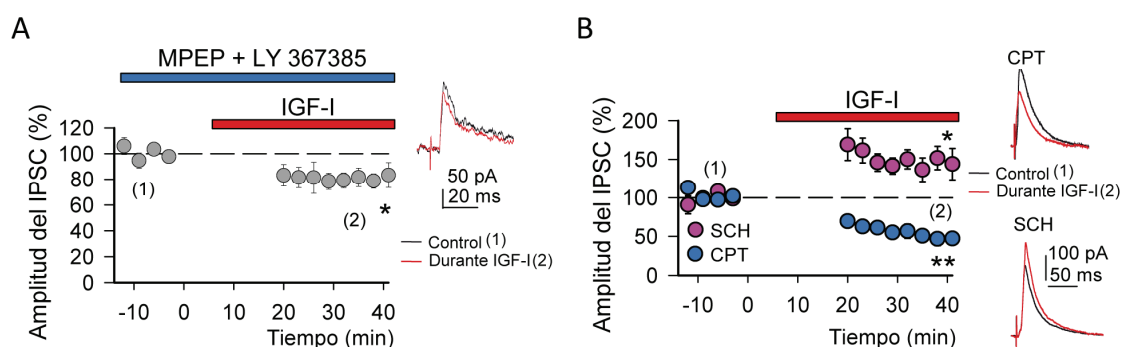


Figura 24. La LTD de la IPSC mediada por IGF-I depende de la activación de los receptores mGluR1 y 5 de glutamato y A_{2A} de adenosina. (A, izquierda) Curso temporal de las IPSCs registradas en MPEP+LY antes y después de la aplicación de IGF-I. **(A, derecha)** Trazos representativos de IPSCs en MPEP+LY en control (trazo negro) y durante IGF-I (trazo rojo). **(B, izquierda)** Curso temporal de la IPSC registrado en CPT (círculos azules) y SCH (círculos rosas), antes y después de la aplicación de IGF-I **(B, derecha)** Trazos representativos de la IPSC control (trazos negros) y durante IGF-I (trazos rojos) en presencia de CPT (superior) y SCH (inferior).

En resumen, el IGF-I induce una LTD presináptica de las IPSC independiente de aumentos de calcio postsináptico y de la activación de los NMDAR que requiere las elevaciones de calcio astrocitarias y la activación de los A_{2A} de adenosina siendo facilitada por la activación de los mGluR.

8. IGF-I induce una LTP de la transmisión sináptica

Para analizar el efecto neto funcional del IGF-I sobre la transmisión sináptica, analizamos la modulación de los PSP por IGF-I, condición en la que tanto la potenciación de las EPSC como la depresión de las IPSC sumados a los aumentos de la R_m estarán influyendo en el tamaño del PSP. De forma análoga al experimento de la figura 10, después de tomar una línea base estable de potenciales postsinápticos (PSP), incrementamos la intensidad de estimulación sináptica hasta que aparecieron las primeras respuestas supraumbrales (como habíamos venido haciendo hasta el momento). Tras 5 minutos se comenzó a perfundir IGF-I durante 15 minutos produciéndose un incremento del número de respuestas con PAs (de 5.16 ± 1.58 a 25.6 ± 4.42 número de PAs antes y durante IGF-I, $n=12$, $p<0.001$; Fig. 25B, barras negra y roja respectivamente). Pasados los 15 minutos, volvimos a los valores de estimulación sináptica del control y se observó una LTP de los PSP (de 100.90 ± 1.04 a 147.09 ± 9.11 % antes y durante IGF-I, $n=12$, $p<0.001$; Fig. 25A). Por tanto, estos resultados demuestran que el efecto global de IGF-I es un aumento a largo plazo de la eficacia de la transmisión sináptica de las neuronas piramidales de capa 2/3.

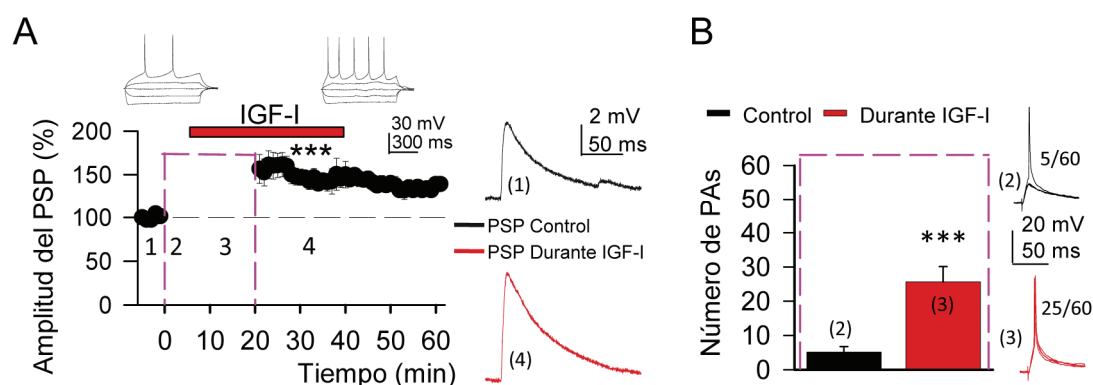


Figura 25. IGF-I induce una LTP del PSP incrementando el número de PAs. (A, izquierda) Curso temporal de los PSPs en ACSF antes, durante y después de la aplicación de IGF-I. **(A, derecha).** Trazos representativos de los PSPs control (trazo negro, 1) y durante IGF-I (trazo rojo, 4). **(B, izquierda)** Gráfico de barras del número de PAs en control (barra negra, 2) y durante la aplicación de IGF-I (barra roja, 3) **(B, derecha).** Trazos representativos de los PSPs+PAs en control (trazos negros, 2) y durante IGF-I (trazos rojos, 3). Nótese el aumento en el número de PAs medidos durante la aplicación de pulsos rectangulares de corriente (I-V) por la pipeta de registro en control (A, I-V superior-izquierda) y después de IGF-I (A, I-V superior-derecha).

Continuamos investigando si la LTP de los PSP inducida por IGF-I dependía o no de la estimulación sináptica. Para ello, procedimos a realizar registros de los PSP, pero esta vez dejamos de estimular sinápticamente durante el periodo de inducción de la plasticidad. Pasados 15 minutos de perfusión de IGF-I sin estimulación sináptica, retomamos la estimulación a valores control observando que se había inducido la LTP de los PSP (de 99.86 ± 0.97 a 132.57 ± 6.17 % antes y durante IGF-I, $n=8$, $p<0.01$; Fig. 26A). Por tanto, se trata de una LTP inducida por IGF-I e independiente de la estimulación sináptica

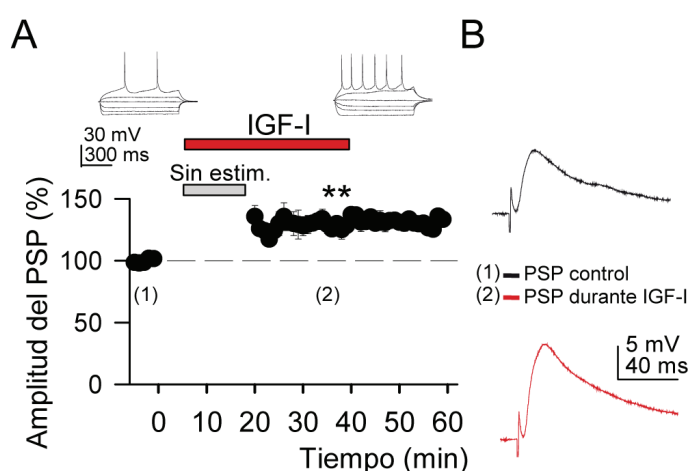


Figura 26. La LTP del PSP inducida por IGF-I no requiere la actividad sináptica evocada por estímulos eléctricos. (A) Curso temporal del PSP en ACSF cuando se aplica IGF-I en ausencia de estimulación sináptica durante los primeros 15 minutos. Nótese que al retomar la estimulación sináptica se observa que IGF-I ha inducido la LTP de los PSPs. (B) Trazos representativos de los PSPs control (trazo negro) y durante IGF-I (trazo rojo). Nótese el aumento en el número de PAs medidos durante la aplicación de pulsos rectangulares de corriente (I-V) por la pipeta de registro en control (A, I-V superior-izquierda) y después de IGF-I (A, I-V superior-derecha).

Dado que tanto la modulación de la transmisión sináptica excitadora (Fig. 18) como la inhibitoria (Fig. 23) por IGF-I requiere los aumentos de calcio en los astrocitos, quisimos comprobar que efectivamente IGF-I actuaba activando a los astrocitos. Para ello analizamos el efecto de IGF-I en la frecuencia de las elevaciones de calcio espontáneas en los astrocitos. Tras registrar las elevaciones de calcio espontáneas, aplicamos IGF-I en el baño y observamos un aumento del número de elevaciones de calcio con respecto al control (de 0.67 ± 0.08 a 1.04 ± 0.1 min^{-1} antes y durante IGF-I, $n=71$, $p<0.01$; Fig. 27A, barras negra y roja respectivamente). Por el contrario, cuando el mismo experimento se realizó en presencia del antagonista del IGF-IR, el NVP-AEW541, no hubo aumentos en la frecuencia de elevaciones de calcio astrocitario

(n=81, p=61; Fig. 27B, barras negra y roja respectivamente). Por tanto, estos resultados demuestran que la activación de los IGF-IR induce aumentos en la frecuencia de las elevaciones de calcio en los astrocitos.

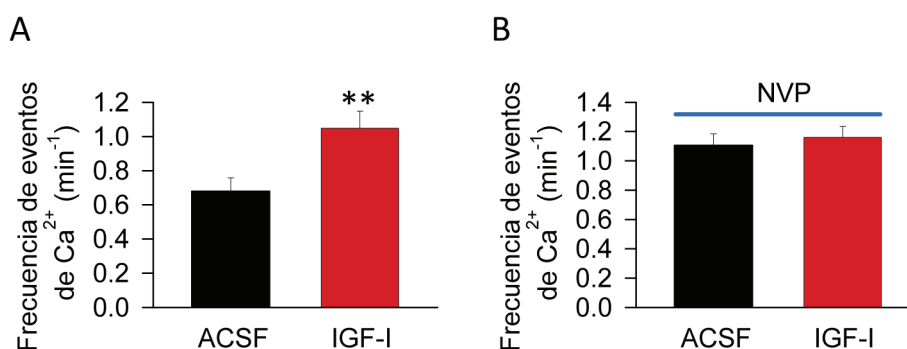


Figura 27. IGF-I incrementa la frecuencia de oscilaciones de calcio citosólico espontáneas en astrocitos de capa 2/3 de la corteza de barriles. (A) Frecuencia de las oscilaciones de calcio citosólico espontáneas en control y durante IGF-I (barras negra y roja respectivamente). (B) Igual que en A, pero en presencia de NVP-AEW541.

9. IGF-I Induce LTP en capa 2/3 de la corteza de barriles in vivo

Para comprobar si una plasticidad sináptica similar a la observada en rodajas era inducida por IGF-I en experimentos in vivo, llevamos a cabo experimentos en los que aplicábamos IGF-I en la corteza de barriles de ratones anestesiados. Para poder medir la eficacia sináptica, en control activamos la vía somatosensorial a través de la estimulación de las vibrisas con un eyector de aire a presión (*puff* aire a 0.2 Hz) y registramos los potenciales de campo (LFP) en capa 2/3 (Fig. 28A). Tras tomar una línea base de control estable de los LFP, se realizaron 6 aplicaciones de IGF-I (1 cada 5 minutos) con una Hamilton localizada próxima (≈ 200 micras) al lugar de registro en capa 2/3. IGF-I indujo una potenciación a largo plazo del LFP (de 100.82 ± 1.02 a 160.10 ± 9.56 % antes y durante IGF-I, n=10, $p < 0.001$; Fig. 28B, círculos rojos). Sin embargo, cuando el IGF-I se sustituyó por suero salino, no hubo cambios significativos en el área del LFP (n=9, $p = 0.53$; Fig. 28B, círculos negros). Estos resultados indican que la elevación de los niveles de IGF-I en la capa 2/3 induce LTP de la transmisión sináptica.

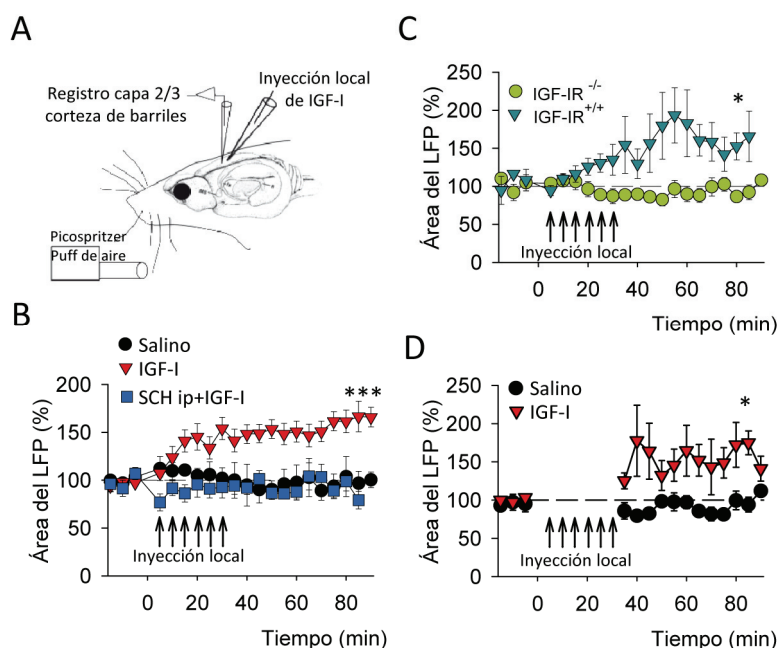


Figura 28. IGF-I induce una potenciación del LFP que depende de la activación de los IGF-IRs en los astrocitos y del receptor de adenosina tipo A_{2A} in vivo. (A) Curso temporal del LFP cuando a los 10 minutos de registro se aplica localmente IGF-I (triángulos rojos), suero salino (círculos negros) e IGF-I en ratones previamente inyectados intraperitonealmente con SCH58261 (cuadrados azules). (B) Curso temporal del LFP cuando a los 10 minutos de registro se aplica localmente IGF-I en ratones con genotipo IGF-IR^{-/-} en astrocitos (triángulos verdes oscuro) y con genotipo IGF-IR^{+/+} (círculos verdes claro). (C) Curso temporal del LFP cuando a los 10 minutos de registro se para la estimulación de la vibrisa y se aplica localmente IGF-I (triángulos rojos) y suero salino (círculos negros). La inyección local consistió en 6 aplicaciones de 84 nanolitros cada una a una frecuencia de 1 aplicación cada 5 minutos. Las flechas negras en cada gráfica indican el momento de cada aplicación.

Cuando los experimentos se realizaron en el ratón con el genotipo IGF-IR^{-/-} en los astrocitos, no se indujo LTP de los LFP ($n=6$, $p=0.21$; Fig. 28C, círculos verdes), al contrario que en los ratones con genotipo IGF-IR^{+/+}, en los que sí se indujo una LTP del LFP al aplicar el IGF-I localmente (de 101.18 ± 7.72 a 165.66 ± 18.44 , $n=4$, $p<0.05$; Fig. 28C, triángulos verdes). Estos experimentos demuestran que la LTP inducida por IGF-I in vivo depende de la activación de los IGF-IR en los astrocitos. Además, esta LTP depende de la activación de los receptores de adenosina A_{2A} porque no se indujo en ratones en los que previamente al IGF-I se les había administrado SCH58261 (2mg/Kg) intraperitoneal ($n=7$, $p=0.17$; Fig. 28B, cuadrados azules). Por tanto, esta LTP inducida

in vivo presenta características similares a la inducida en rodajas dependiendo de la activación de los IGF-IR en los astrocitos y los receptores de adenosina A_{2A}.

Además, quisimos comprobar si al igual que en los registros in vitro, también se inducía plasticidad por IGF-I si este se aplicaba en ausencia de actividad sináptica evocada por estimulación de la vía somatosensorial. De esta manera, y tras tomar una línea base estable de los LFP, procedimos a la aplicación del IGF-I, pero esta vez sin estimular la vía sensorial con los *puff* de aire. Al terminar las 6 aplicaciones de IGF-I con la Hamilton, se retomó la estimulación de las vibrisas a la misma frecuencia que en control (0,2 Hz). En este caso, y al igual que en los registros in vitro, el IGF-I fue capaz de inducir la LTP de los LFP (de 101.92 ± 1.92 a 153.37 ± 15.82 , $n=4$, $p<0.05$; Fig. 28D, triángulos rojos) que no se produjo cuando el mismo experimento se realizó inyectando suero salino en vez de IGF-I ($n=8$, $p=0.62$; Fig. 28D, círculos negros). Una vez más, el fenómeno mostrado en rodajas se reproducía en los resultados de los registros electrofisiológicos in vivo, sugiriendo que probablemente sea el mismo tipo de plasticidad.

10. IGF-I induce metaplasticidad

La metaplasticidad es un mecanismo homeostático que cambia el umbral para la generación de la plasticidad sináptica, y por tanto se define como los cambios en la plasticidad sináptica dependiente de la experiencia (Feldman, 2009). Dado que la Acetilcolina en el hipocampo es capaz de inducir LTP de los LFP independiente de la activación de los NMDAR y metaplasticidad en la LTP hebbiana (Fernandez de Sevilla et al., 2008), nos preguntamos si de forma análoga IGF-I podría estar mediando metaplasticidad en las rodajas de la corteza barriles. Tras tomar una línea base estable de los PSP, se aplicó el protocolo de STDP que consistía en un PSP seguido 10 ms después por un PA evocado con un pulso de corriente aplicado a través de la pipeta de registro. Se hicieron distintos experimentos con diferente número de apareamientos entre el PSP y el AP (10, 20 y 50 apareamientos). Los resultados mostraron que en control solo se induce LTP cuando se aplican 50 apareamientos PSP-AP (de 96.01 ± 4.12 a 137.62 ± 8.33 % antes y 40 minutos después de las 50 asociaciones, $n=7$, $p<0.001$; Fig. 29A triángulos. Con 20 asociaciones, $n=6$, $p=0.83$; Fig. 29A, círculos. Con

10 asociaciones, $n=5$, $p=0.97$; Fig. 29A, cuadrados). Del mismo modo, pero en células cercanas ($\approx 75 \mu\text{m}$) a las que previamente se registró la LTP del PSP inducida por IGF-I, se llevaron a cabo experimentos similares. En este caso, después de haber inducido LTP por IGF-I, 20 apareamientos fueron suficientes para inducir la LTP por STDP (para 20 asociaciones de 99.36 ± 1.08 a 141.59 ± 4.38 % antes y 40 minutos tras las asociaciones, $n=6$, $p<0.001$; Fig. 29B, círculos. Para 50 asociaciones de 99.36 ± 0.89 a 169.13 ± 7.36 antes y 40 minutos tras las asociaciones, $n=6$, $p<0.001$; Fig. 29B, triángulos. Para 10 asociaciones, $n=5$, $p=0.92$; Fig. 29B, cuadrados). Es más, a las neuronas que después de la LTP de IGF-I se les aplicó 50 apareamientos mostraron una LTP por STDP mucho mayor que las que se les aplicó 50 apareamientos en condiciones control (de 37.62 ± 8.33 % en control a 69.13 ± 7.36 % de potenciación después de la LTP por IGF-I, $p<0.001$). Por tanto, estos resultados demuestran que IGF-I induce metaplasticidad, ya que después de IGF-I se reduce el número de veces que la neurona pre y postsináptica se tienen que activar simultáneamente para inducir la LTP Hebbiana y que para el mismo número de asociaciones después de IGF-I se produce un aumento en la magnitud de la LTP Hebbiana.

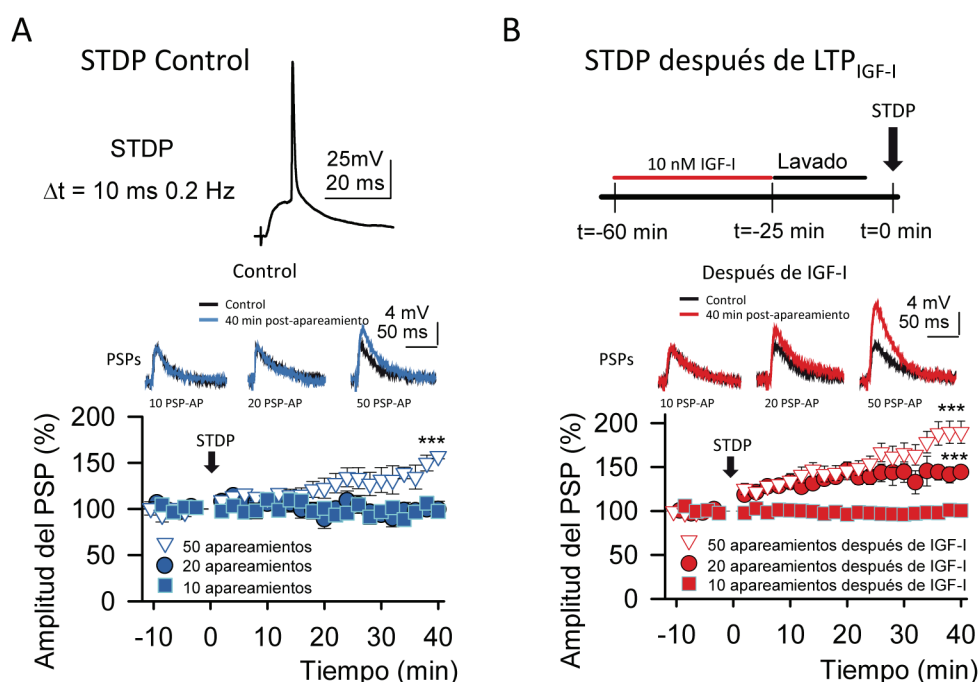


Figura 29. IGF-I induce metaplasticidad en neuronas piramidales de capa 2/3 de la corteza de barriles. **(A, arriba)** Trazo representativo de un apareamiento entre un PSP y un PA separados 10 ms y evocados a una frecuencia de 0.2 Hz. **(A, abajo)** Curso temporal del PSP antes y después de la aplicación de 10, 20 y 50 apareamientos (cuadrado, círculo y triángulo, respectivamente) de un PSP+PA en ACSF. Los trazos representativos de cada apareamiento con respecto a su control aparecen por encima del curso temporal. Nótese que únicamente cuando se realizan 50 apareamientos se produce una LTP. **(B, arriba)** Esquema del experimento en el que se analiza la STDP después de haber inducido LTP por IGF-I. **(B, abajo)** Igual que en A abajo pero después de haber inducido LTP por IGF-I. Nótese que a diferencia de ACSF, tras la exposición con IGF-I, las neuronas a las que se le aplicaron 20 apareamientos mostraron LTP por STDP. Además, las de 50 apareamientos tuvieron una mayor LTP por STDP que en ACSF.

De igual manera, quisimos comprobar si la metaplasticidad inducida por IGF-I ocurría también in vivo. Para ello, después de inducir la LTP de los LFP in vivo con IGF-I se indujo una LTP dependiente de la activación de los NMDAR que produce una facilitación de la respuesta táctil (Barros-Zulaica et al., 2014). Se sabe que esta LTP dependiente de la activación de los NMDAR se induce cuando se estimula de forma repetitiva la vibrisa a 8 Hz, pero no a 5 Hz. Como se muestra en la figura 25, la estimulación de la vibrisa de forma repetitiva a 5 Hz produjo una LTP de los LFP en ratones que previamente habían expresado la LTP por IGF-I (de 160.10 ± 9.56 a 227.30 ± 23.38 % antes y después del tren de 5 Hz, $n=10$, $p<0.05$; Fig. 30A, triángulos rojos). Sin embargo, en aquellos ratones que no habían expresado la LTP por IGF-I porque fueron inyectados con salino en vez de IGF-I, no mostraron LTP de los LFP ($n=9$, $p=0.12$; Fig.

30A, círculos negros), lo que indica que in vivo IGF-I también disminuye el umbral para producir plasticidad sináptica Hebbiana.

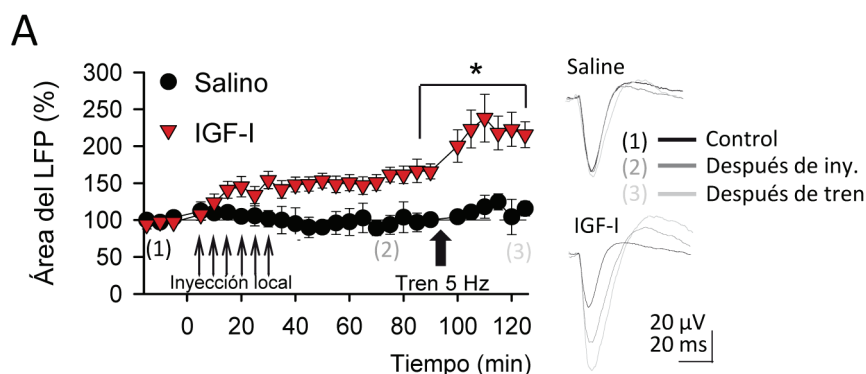


Figura 30. IGF-I induce metaplasticidad in vivo. (A, izquierda) Curso temporal del área de los LFP cuando se inyecta suero salino o IGF-I (círculos negros y triángulos rojos respectivamente) y 60 minutos después se estimula repetitivamente la vibrisa a una frecuencia de 5 Hz (flecha negra gruesa). **(A, derecha)** Arriba se muestran los trazos representativos de los LFP en control (1, trazo negro), después de la inyección de suero salino (2, Trazo gris oscuro) y tras la aplicación de un tren de 5 Hz (3, Trazo gris claro). Debajo se muestran los mismos trazos, pero cuando se inyecta IGF-I en vez de salino. Nótese que cuando se aplica salino no se induce plasticidad sináptica ni por la propia inyección ni por la aplicación de la estimulación repetitiva a 5 Hz de la vibrisa, mientras que cuando se aplica IGF-I se induce LTP del LFP por IGF-I y LTP del LFP por estimulación repetitiva a 5 Hz de la vibrisa 60 minutos después.

11. IGF-I facilita la adquisición y el recuerdo de la memoria de extinción del miedo condicionado

Desde hace algunas décadas, la memoria de extinción del miedo condicionado ha sido objeto de estudio. Las investigaciones han intentado desgranar los mecanismos subyacentes a este proceso en sus diferentes áreas implicadas, entre ellas la corteza infralímbica. Nuestro objetivo fue analizar el posible papel del IGF-I en la modulación de la memoria de extinción del miedo condicionado. Para estudiar el efecto de IGF-I sobre la extinción del miedo condicionado, realizamos una habituación de los animales tanto a los investigadores que les iban a manipular como al contexto experimental para minimizar las respuestas de estrés y por tanto disminuir variables que pueden interferir en los resultados. 24 horas después, se asoció el estímulo condicionado, que en este caso fue un sonido continuo durante 30 segundos, con el estímulo incondicionado, que consistió en un choque eléctrico en las patas el último medio segundo de los 30 que duró el sonido (ver métodos y materiales). El tercer día se administró localmente con una Hamilton 0.5 μ l de IGF-I, suero salino o NVP-AEW541

media hora antes del comienzo de las sesiones de extinción, que consistieron en exponer a los animales únicamente al estímulo condicionado. Finalmente, el cuarto día se realizaron sesiones de recuerdo de la extinción para evaluar la consolidación de la memoria.

Como muestran los resultados de la figura 31, la aplicación de IGF-I (círculos rojos) facilitó la adquisición de la memoria de extinción (día 3 figura), así como el recuerdo de la misma 24 horas después respecto a los experimentos en los que se inyectó salino (círculos negros). Esta facilitación de la adquisición y recuerdo de la memoria de extinción inducida por IGF-I estuvo ausente en aquellos animales en los que se coinyectó IGF-I con NPV-AEW541, el antagonista del IGF-IR.

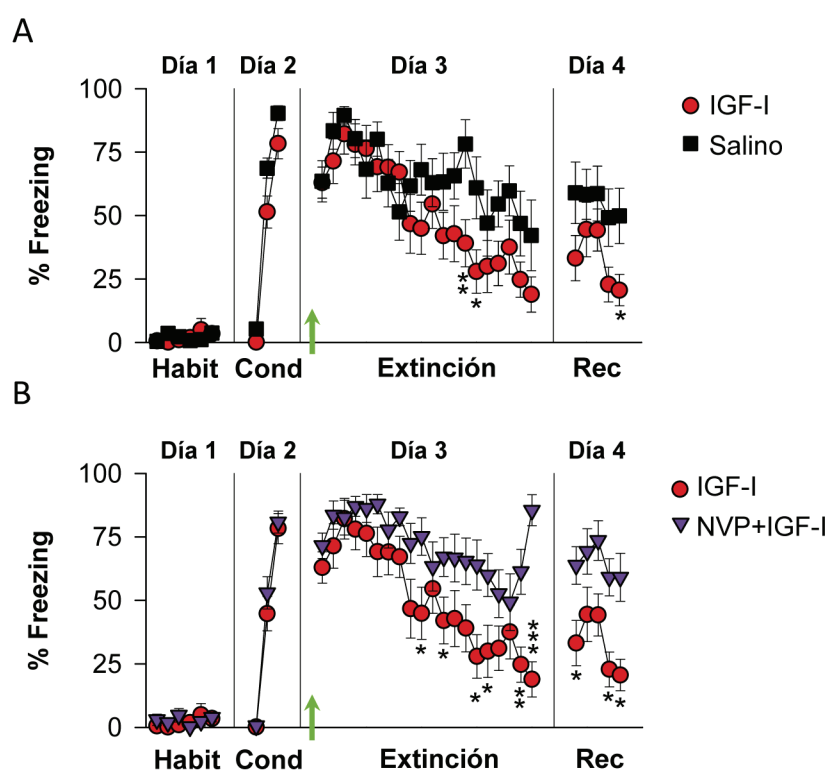


Figura 31. IGF-I facilita la memoria de extinción del miedo condicionado y mejora el recuerdo 24 horas después. (A) Curso temporal del porcentaje del freezing durante la habituación (día 1), el condicionamiento (día 2), la extinción (día 3) y el recuerdo de la extinción del miedo condicionado (día 4), en ratas inyectadas 30 minutos antes del comienzo de la extinción (flecha verde) con suero salino (cuadrados negros) o con IGF-I (círculos rojos). (B) Igual que en A, pero comparando las ratas inyectadas con IGF-I (mismo grupo que en A) respecto de las inyectadas con NVP-AEW541+IGF-I (triángulos morados).

De modo que la interacción del IGF-I con su receptor facilita la memoria de extinción del miedo condicionado y el recuerdo de la misma 24 horas después.

12. IGF-I aumenta la excitabilidad y la R_m , e inhibe la sl_{AHP} en corteza infralímbica

Se ha demostrado que tras el test de la memoria de extinción del miedo condicionado, las neuronas de la corteza infralímbica tienen aumentada la excitabilidad con respecto a las que no han extinguido (Santini et al., 2008). Nosotros hemos comprobado en rodajas de corteza infralímbica que, al igual que en corteza somatosensorial, el IGF-I produce un incremento de la excitabilidad en neuronas piramidales de capa 5 (de 4.37 ± 0.78 a 7.5 ± 0.75 número de PAs antes y durante IGF-I; $n=14$, $p<0.01$; Figura 32D). Además, este incremento va acompañado de un aumento de la R_m (de 136.37 ± 13.97 a 205.37 ± 16.31 M Ω , medidas como la pendiente de la relación corriente-voltaje o I-V; $n=14$, $p<0.01$; Figura 32D).

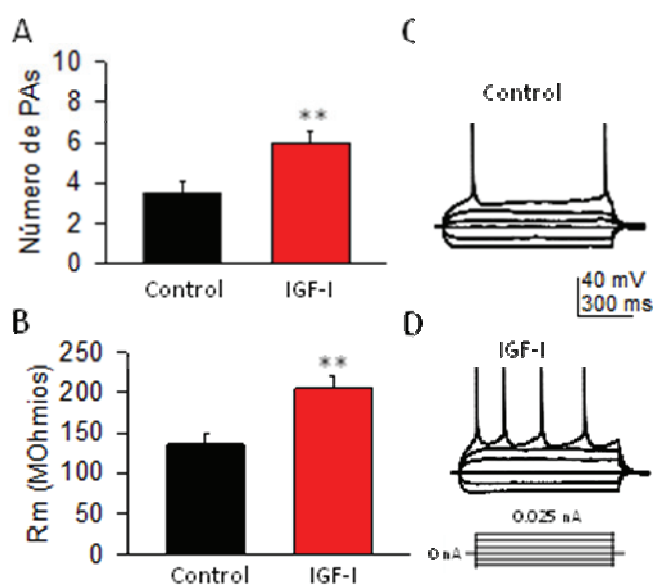


Figura 32. IGF-I aumenta la excitabilidad y la R_m en neuronas piramidales de capa 5 de la corteza infralímbica. (A) Gráfico de barras que muestra el número de PAs antes (control, barra negra) y durante la exposición a IGF-I (IGF-I barra roja). (B) Igual que A, pero mostrando R_m en vez de PAs (C y D) Trazos representativos de las respuestas en voltaje a la inyección de pulsos rectangulares de corriente (D debajo) en control (C) y durante IGF-I (D) respectivamente.

Uno de los mecanismos que modulan la memoria de extinción del miedo condicionado es la regulación de las conductancias de potasio activadas por calcio. De hecho, es bien conocido que la disminución de estas conductancias facilita la memoria del miedo condicionado (Santini et al., 2008; Santini and Porter, 2010; Fontanez-Nuin et al., 2011; Santini et al., 2012; Sepulveda-Orengo et al., 2013). En concreto, las corrientes de potasio activadas por calcio de cinética lenta, las sl_{AHP} , que se generan tras un tren de PAs. Estas corrientes son de suma importancia en el control de la

excitabilidad neuronal ya que participan en la adaptación y repolarización del potencial de acción (Wu, 2004; Fernandez de Sevilla et al., 2007). Por tanto, quisimos analizar si estas corrientes podrían ser reducidas por el IGF-I explicando así su acción facilitadora en la memoria de extinción.

Para analizar el efecto del IGF-I sobre la sI_{AHP} , tomamos un control estable de la amplitud de las sI_{AHP} durante 10 minutos. A continuación, se comenzó a perfundir IGF-I en el baño y este produjo una disminución de la amplitud de las sI_{AHP} (de 100.12 ± 1.07 a 61.35 ± 6.65 % antes y durante IGF-I, $n=6$, $p<0.01$; Fig. 33A, círculos verdes claros). Sin embargo, cuando el IGF-I fue perfundido en presencia del antagonista del IGF-IR no se indujo ningún cambio en la amplitud de las mismas ($n=5$, $p=0.61$; Fig. 33A, círculos verdes oscuro). De modo que el IGF-I produce una depresión de las sI_{AHP} . Esto pone en relieve uno de los posibles mecanismos por los que este péptido podría estar facilitando la memoria del miedo condicionado.

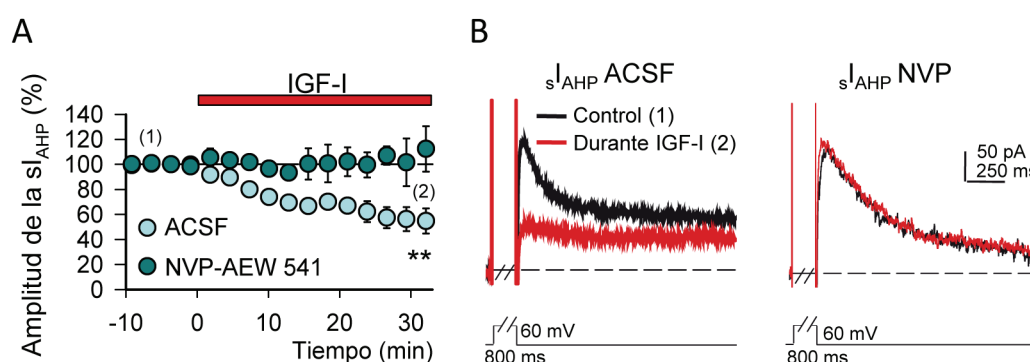


Figura 33. IGF-I reduce las sI_{AHP} . (A) Curso temporal de la amplitud de la corriente sI_{AHP} antes y durante la perfusión con IGF-I en ACSF (círculos verdes claro) y en NVP-AEW541 (círculos verdes oscuro). (B) Trazos representativos de las corrientes sI_{AHP} en control (1, trazos negros) y durante la perfusión de IGF-I (2, trazos rojos) en ACSF (izquierda) y en NVP-AEW541 (derecha). (Triángulos lilas).

Para comprobar si este efecto de depresión de las sI_{AHP} mediado por IGF-I era a corto o largo plazo realizamos el mismo experimento, pero lavando el IGF-I del medio. En este caso pudimos comprobar que se trataba de una depresión que se mantenía en el tiempo aun cuando el IGF-I se había lavado (de 100.66 ± 0.74 a 57.04 ± 6.11 % antes y durante IGF-I, $n=9$, $p<0.001$; Fig. 34A) es decir, una depresión a largo plazo de las sI_{AHP} .

Además, quisimos estudiar si este efecto depresor de las sI_{AHP} por el IGF-I requería la activación de estos canales a la vez que se aplicaba el IGF-I. Para contestar a esta pregunta, una vez tomada una línea base control de las sI_{AHP} dejamos de evocarlas y añadimos IGF-I. Pasados 20 minutos, se volvieron a generar las sI_{AHP} y observamos que estaban deprimidas (de 101.88 ± 1.58 a 57.70 ± 8.48 % antes y durante IGF-I, $n=6$, $p<0.01$; Fig. 34B). Por tanto, este resultado demuestra que la depresión de las sI_{AHP} no requiere que estas estén siendo generadas durante la aplicación del IGF-I.

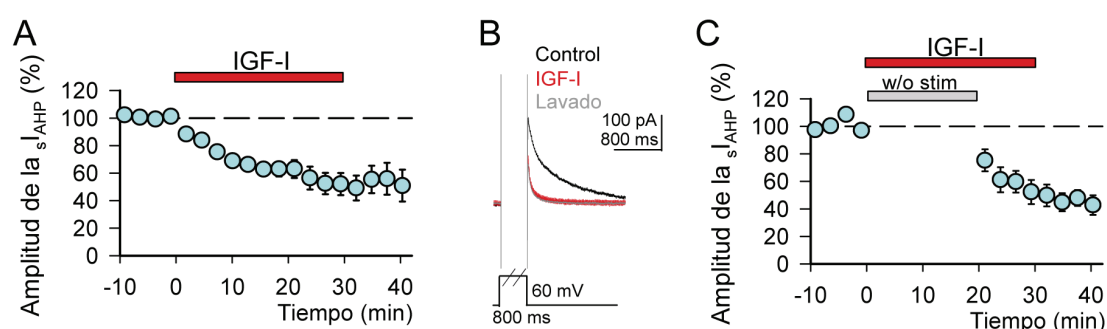


Figura 34. IGF-I induce una depresión a largo plazo de las sI_{AHP} . (A) Curso temporal de la amplitud de las corrientes $sAHP$ antes, durante y después de la perfusión de IGF-I. (B) Trazos representativos de las $sAHP$ antes, durante y después de la perfusión de IGF-I. (C) Igual que en A, pero dejando de generar la $sAHP$ durante los primeros 20 minutos de perfusión con IGF-I. Nótese que IGF-I sigue siendo capaz de reducir la amplitud de las $sAHP$ aunque estas corrientes no estén siendo generadas.

Quisimos analizar si las sI_{AHP} se modulaban durante la memoria de extinción del miedo condicionado en los distintos grupos estudiados. Para ello, analizamos la amplitud de las sI_{AHP} en neuronas piramidales de capa 5 de la IL tras la realización del recuerdo de la extinción (4º día), en ratas pertenecientes a los distintos grupos (Salino, IGF-I e IGF-I+NVP-AEW541). El análisis ANOVA mostró diferencias significativas entre los tres grupos ($p<0.001$; Fig. 35), siendo la amplitud de las ratas inyectadas con IGF-I menor que el resto de los otros grupos, lo que indica una correlación entre la reducción en las sI_{AHP} y la memoria de extinción del miedo condicionado.

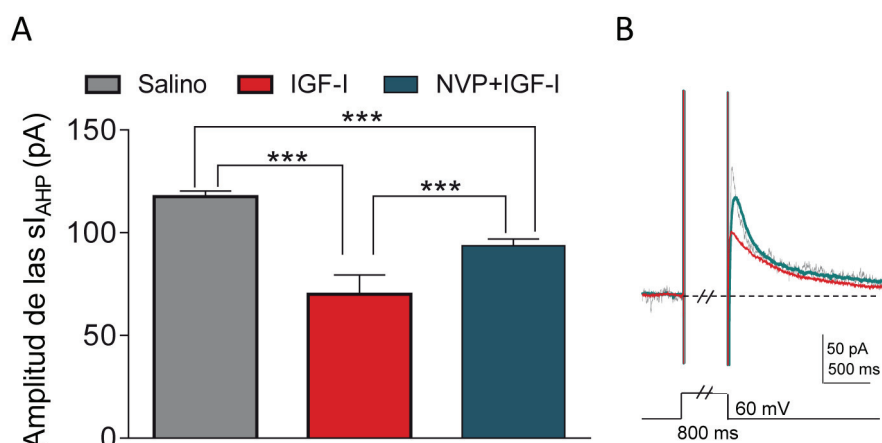


Figura 35. Los animales en los que se inyectó IGF-I localmente 30 minutos antes de aplicar los protocolos de extinción mostraron unas sIHP de menor amplitud que los tratados con suero salino o NVP-AEW541+IGF-I después de haber realizado el recuerdo de la memoria de extinción. (A) Gráfico de barras de la amplitud de las sIHP registradas en neuronas de capa 5 de rodajas de la IL obtenidas en ratas después del recuerdo de la extinción que habían sido tratadas con suero salino, IGF-I y NVP-AEW541+IGF-I 30 minutos antes de aplicar los protocolos de extinción (Barras gris, roja y verde respectivamente). (B) Trazos representativos de las sIHP registradas en A (salino trazo gris, roja IGF-I y verde NVP-AEW541+IGF-I).

Para demostrar que cuando no añadimos IGF-I no se producen cambios las sIHP realizamos registros de las sIHP durante 35 minutos de registro observando que no se producían cambios en la amplitud de las sIHP ($n=4$, $p=0.67$; Fig. 36A) al no añadir IGF-I.

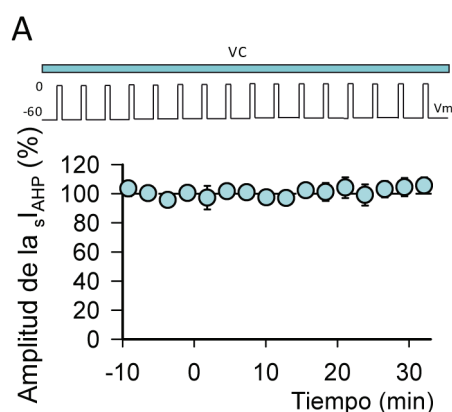


Figura 36. La activación continuada de las sIHP no produce cambios en sus amplitudes. (A, arriba) Protocolo de inducción de las sIHP consistente en pulsos despolarizantes de 60mV y 800 ms. (A, abajo) Curso temporal de la amplitud de las corrientes lentas AHP durante 35 minutos de registro.

14. IGF-I induce plasticidad de la transmisión sináptica excitadora e inhibitora en la capa 5 de la corteza infralímbica

La mayoría de los estudios hacen referencia a los cambios de excitabilidad y plasticidad intrínseca de la corteza infralímbica durante la extinción del miedo

condicionado. Sin embargo, algunos han demostrado que durante este fenómeno se produce plasticidad sináptica ya que la relación AMPA/NMDA aumenta en la corteza infralímbica durante la memoria de extinción (Sepulveda-Orengo et al., 2013). Por tanto, la pregunta que a continuación quisimos responder era si el IGF-I estaba produciendo cambios en la modulación de la transmisión sináptica en la corteza infralímbica que pudieran justificar la mejora de la memoria de extinción observada en los estudios de comportamiento.

Para ello, aislamos la transmisión sináptica excitadora e inhibitora y analizamos el efecto de IGF-I. Registramos las EPSC con PiTX y tras tomar una línea base estable como control se comenzó a perfundir IGF-I. Éste produjo una LTD de la EPSC que continuó aun cuando el IGF-I fue lavado (de 97.36 ± 1.39 a 72.62 ± 6.55 % antes y durante IGF-I, $n=5$, $p<0.05$; Fig. 37A, círculos morados). Esta LTD de la EPSC estuvo ausente cuando se aplicó IGF-I en presencia del antagonista del IGF-IR, el NVP-AEW541 ($n=5$, $p=0.22$; Fig.37A, círculos marrones). El análisis tanto del CV como de la PPR mostraron que esta LTD de las EPSC está acompañada de una disminución en la probabilidad de liberación del glutamato (de 1.12 ± 0.06 a 1.36 ± 0.07 , $n=5$, $p<0.05$ PPR, Fig. 37B; CV, $R^2 = 0.656$, Fig. 37C).

Para determinar si esta LTD de las EPSC requería la activación sináptica evocada además del IGF-I, realizamos experimentos en los que parábamos la estimulación sináptica y aplicábamos IGF-I. En estos experimentos pasados 15 minutos en los que no se había estimulado sinápticamente, pero se había añadido IGF-I, observamos que al volver a estimular no se había modificado la amplitud de las EPSC ($n=6$, $p=0.94$; Fig. 37D). Sin embargo, después de 10 minutos de estar evocando las EPSC en presencia de IGF-I estas se empezaron a reducir y se indujo la LTD de las EPSC (de 99.06 ± 1.06 a 73.40 ± 6.79 % antes y durante IGF-I, $n=6$, $p<0.05$; Fig. 37D). Estos resultados indican que la LTD de las EPSC requiere la presencia de IGF-I y la activación de la sinapsis para su inducción, expresándose como una disminución de la Pr a largo plazo.

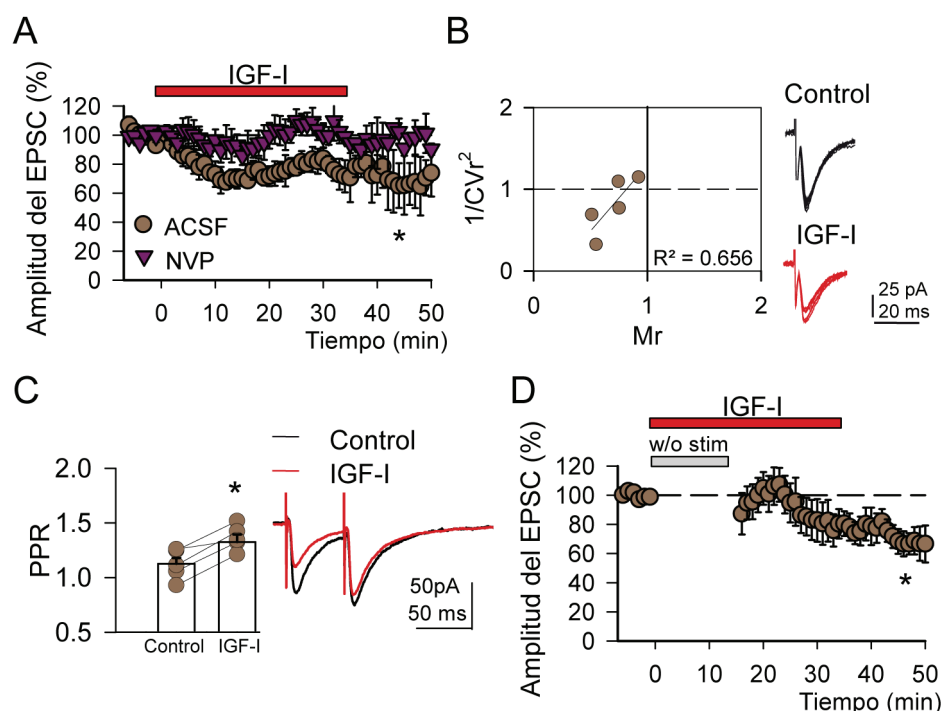


Figura 37. IGF-I induce una LTD presináptica de la EPSC que requiere la actividad sináptica evocada por estímulos eléctricos. (A) Curso temporal de la amplitud de las EPSCs antes, durante y después de la aplicación de IGF-I en ACSF y en NVP-AEW541 (círculos marrones y morados respectivamente). **(B)** Representación gráfica de la PPR (R_2/R_1) antes y durante la perfusión de IGF-I (barras negra y roja respectivamente). **(C)** Representación gráfica del $1/Cvr^2$ respecto de Mr. Nótese que los puntos siguen una diagonal lo que indica un origen presináptico de la depresión mediada por IGF-I. **(D)** Igual que en (A) pero sin estimular los 15 primeros minutos de la aplicación de IGF-I (barra gris sin estim). Nótese que la modulación de las EPSCs por IGF-I requiere de la estimulación sináptica además de la presencia del IGF-I.

A continuación, estudiamos el efecto de IGF-I en la transmisión sináptica inhibitoria. Para ello aislamos las IPSC con CNQX+D-AP5, antagonistas de los receptores ionotrópicos de glutamato AMPA y NMDA, respectivamente. Igual que para las EPSC, tomamos una línea base estable de las IPSC como control y añadimos IGF-I al baño. Éste indujo una LTD de las IPSC (de 99.06 ± 0.83 a 65.95 ± 9.92 % antes y durante IGF-I, $n=6$, $p<0.05$; Fig. 38A). Cuando el experimento se realizó en presencia de NVP-AEW541, IGF-I no indujo cambios en las IPSC ($n=6$, $p=0.98$; Fig. 38A, triángulos morados), lo que indicaba que se requiere la activación de los IGF-IR. Además, esta depresión se expresaba presinápticamente ya que cuando se aplicó el análisis de la PPR y del CV indicaron ambos una disminución en la probabilidad de liberación (de 1.13 ± 0.06 a 1.34 ± 0.06 antes y durante IGF-I, $n=6$, $p<0.05$, PPR Fig. 38B; CV, $R^2=0.5324$, Fig. 38C). Para estudiar si la inducción de la LTD de las IPSC requiere la

estimulación sináptica evocada de las sinapsis inhibitoras además de la aplicación de IGF-I, realizamos experimentos similares al de la figura 38A parando la estimulación sináptica antes de poner el IGF-I. Después de 15 minutos de IGF-I se volvió a estimular sinápticamente y se observó que las IPSC se habían deprimido por el IGF-I (de 98.91 ± 1.55 a 41.99 ± 7.40 % antes y durante IGF-I, $n=6$, $p<0.001$; Fig. 38D). Por tanto, estos resultados indican que la LTD de las IPSC requiere la presencia de IGF-I pero no la activación de la sinapsis para su inducción, expresándose como una disminución de la Pr a largo plazo.

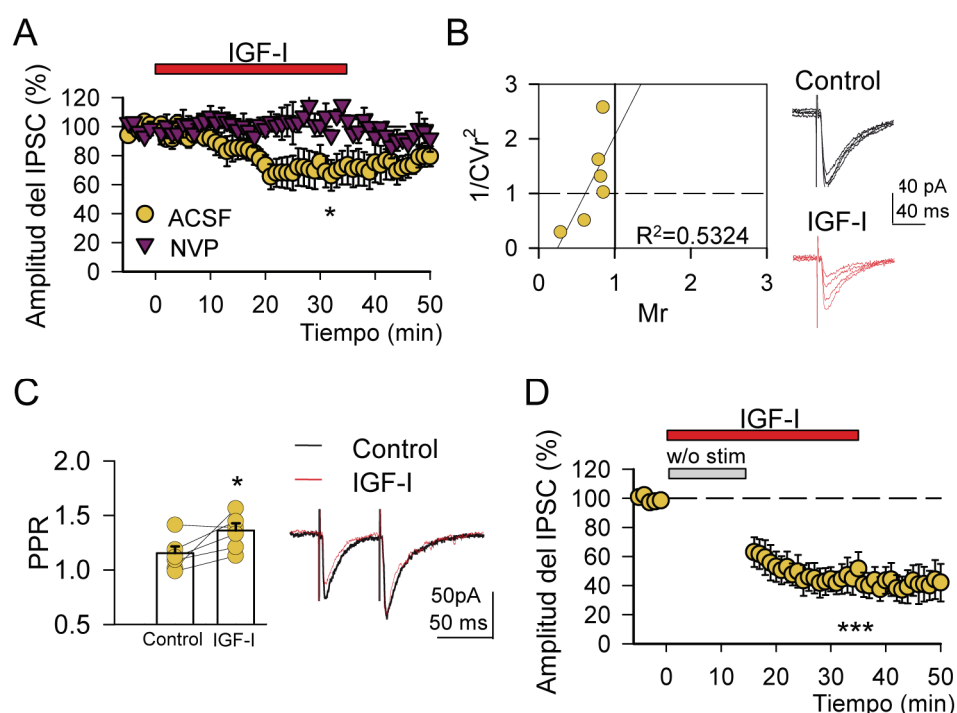


Figura 38. IGF-I induce una LTD presináptica de la IPSC que no requiere la actividad sináptica evocada por estímulos eléctricos. (A) Curso temporal de la amplitud de las IPSCs antes, durante y después de la aplicación de IGF-I en ACSF y en NVP-AEW541 (círculos marrones y morados respectivamente). (B) Representación gráfica de la PPR ($R2/R1$) antes y durante la perfusión de IGF-I (barras negra y roja respectivamente). (C) Representación gráfica del $1/Cvr2$ respecto de Mr. Nótese que los puntos siguen una diagonal lo que indica un origen presináptico de la depresión mediada por IGF-I. (D) Igual que en (A) pero sin estimular los 15 primeros minutos de la aplicación de IGF-I (barra gris sin stim). Nótese que la modulación de las EPSCs por IGF-I no requiere de la estimulación sináptica.

Por tanto, estos resultados muestran que el IGF-I es capaz de modular presinápticamente la transmisión sináptica excitadora e inhibitora. Aunque la modulación de la transmisión sináptica excitadora necesita además de IGF-I la

activación de las sinapsis, la modulación de la transmisión sináptica inhibitora solo requiere la presencia de IGF-I al igual que ocurre con la disminución de las sl_{AHP} .

15. IGF-I induce una LTP de los PSP

Después de haber estudiado el efecto del IGF-I sobre la transmisión excitadora e inhibitora de manera aislada, quisimos estudiar su acción conjunta sobre los PSP.

En este caso, y posterior a tomar un control estable de los PSP, aumentamos la intensidad de estimulación hasta que aparecieron las respuestas supraumbrales y se registraron durante 5 minutos ($\approx 10\%$). Finalizado este tiempo se añadió IGF-I y el número de potenciales de acción aumentó (de 4.83 ± 1.53 a 24.83 ± 7.40 número de PA antes y durante IGF-I, $n=6$, $p<0.05$; Fig. 39A). Transcurridos 15 minutos con IGF-I, se volvió a los valores controles de estimulación y se monitorizaron los PSP, observando que se habían potenciado (de 100.62 ± 0.41 a $129.48 \pm 1.59\%$ antes y durante IGF-I, $n=6$, $p<0.001$; Fig. 39B). Además, cuando el IGF-I fue lavado, la potenciación se mantuvo, mostrando una LTP de los PSP inducida por IGF-I.

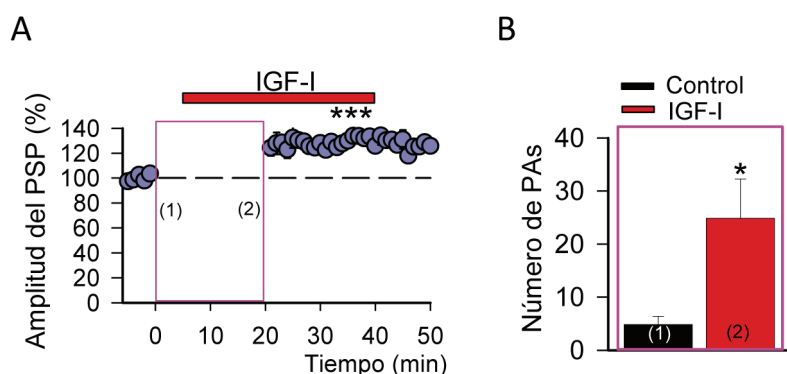


Figura 39. IGF-I induce LTP del PSP. (A)Curso temporal de la amplitud del PSP antes, durante y después de IGF-I. **(B)**Grafica de barras del Número de PAs en control y durante cinco minutos de exposición a IGF-I. Nótese aumento de PAs fue medido en el tiempo indicado por línea rosa.

Con todos los datos juntos, estos resultados indican que el IGF-I facilita la memoria de extinción del miedo condicionado y el recuerdo de la misma. Además, IGF-I reduce las sl_{AHP} e induce LTP de los PSP, incrementando la excitabilidad neuronal. Estos efectos moduladores del IGF-I probablemente actúan aumentando la actividad de la IL y la salida de información hacia la amígdala, sugiriendo que probablemente sean estos los mecanismos celulares implicados en la facilitación de la memoria de extinción del miedo condicionado.

V. DISCUSIÓN

1. Modulación por IGF-I en la corteza de Barriles

El estudio del IGF-I como neuromodulador ha puesto en relieve la importancia de este factor trófico en procesos de neuroplasticidad. Además, el hecho de que sus niveles en el SNC puedan variar permite una versatilidad en su efecto como modulador de la actividad neuronal. En esta tesis doctoral se establecen los efectos moduladores del IGF-I en las neuronas piramidales de capa 2/3 de la corteza de barriles del ratón, habiéndose demostrado su implicación en la modulación de las propiedades intrínsecas, así como en la eficacia tanto de la transmisión sináptica excitadora como de la inhibitoria. El efecto global de esta modulación es un aumento de transmisión sináptica a largo plazo que puede registrarse tanto *in vitro* como *in vivo* y que favorece la inducción posterior de plasticidad sináptica Hebbiana dependiente de la activación de los NMDAR.

1.1 Modulación de las propiedades intrínsecas y la excitabilidad

La importancia del estudio de las propiedades intrínsecas y su modulación radica en que estas propiedades determinan la capacidad de integración de la información por parte de las neuronas. Los resultados descritos en esta tesis doctoral muestran cómo el IGF-I es capaz de aumentar la R_m y la excitabilidad de las neuronas piramidales de la capa 2/3 de la corteza de barriles. Resultados similares habían sido previamente descritos en las neuronas de los núcleos de la columna dorsal donde se demostró tanto *in vitro* como *in vivo*, siendo esta modulación de las propiedades intrínsecas dependientes de la activación de la vía de señalización MAPK/ERK (Nuñez et al., 2003). Por tanto, aunque en esta tesis no se han estudiado los mecanismos de la modulación de la excitabilidad por IGF-I probablemente puedan estar implicadas las mismas vías. El aumento en R_m y excitabilidad inducido por IGF-I podría explicar el aumento de la actividad del ECG en la corteza somatosensorial primaria (S1) dependiente de IGF-I descrito tanto en ratas como en macacos (Trueba-Sáiz et al., 2013). Así, la modulación de las propiedades intrínsecas por IGF-I es un mecanismo de acción que opera en diversas áreas del SNC y podría estar participando en la recepción, integración y emisión de la información que utilizan las neuronas cuando aumentan los niveles de IGF-I.

1.2 Modulación de la transmisión sináptica excitadora

Las acciones neuromoduladoras del IGF-I demostradas hasta la fecha van más allá de la modulación de las propiedades intrínsecas. Su papel sobre la modulación de la transmisión sináptica, aunque sigue siendo objeto de debate cada vez está más consolidada. Nuestros resultados demuestran que el IGF-I induce una STP de la transmisión sináptica excitadora sin cambios en la Pr e independiente de la activación de los NMDAR. De acuerdo con estos resultados, se había demostrado una STP de las EPSC similar en el hipocampo, donde el IGF-I incrementa a corto plazo el componente AMPA en ratas jóvenes, y tanto el AMPA como el NMDA en ratas adultas y viejas (Ramsey, 2005; Molina et al., 2012). Por tanto, esta potenciación de la transmisión sináptica excitadora transitoria parece ser común a dos estructuras corticales, como son el hipocampo y el neocortex. Aunque en esta tesis doctoral no hemos aislado el componente AMPA y el NMDA de la transmisión sináptica excitadora, lo más plausible sería un aumento en el componente AMPA dado que estamos registrando animales jóvenes, aunque no podemos descartar el aumento del componente NMDA.

En las últimas décadas ha quedado demostrado que los astrocitos juegan un papel fundamental al formar parte de las sinapsis (las llamadas sinapsis tripartitas), habiéndose descrito varias formas de plasticidad sináptica dependientes de la actividad astrocitaria. Así, nuestros resultados demuestran que la inducción de la STP de la EPSC por IGF-I requiere la activación de los astrocitos, ya que se previene cuando se evitan los aumentos de calcio citosólico en los astrocitos. Los astrocitos poseen numerosos receptores para neurotransmisores en su membrana lo que les permite responder con aumentos de calcio citosólico a los neurotransmisores liberados por las neuronas, y a su vez liberar gliotransmisores como el glutamato y el ATP que modulan la transmisión sináptica (Covelo and Araque, 2018). Además, se ha descrito la presencia del IGF-IR en la membrana de los astrocitos. Por tanto, es posible que la activación de los astrocitos por el aumento en los niveles de IGF-I esté generando los aumentos de su calcio citosólico que inducen la liberación de ATP y/o glutamato que actuarían induciendo la STP de las EPSC. De hecho, en esta tesis demostramos que IGF-I incrementa la frecuencia de los aumentos de calcio citosólico espontáneos en los

astrocitos, sugiriendo que estos podrían responder al IGF-I liberando gliotransmisores. Así la STP de las EPSC inducida por IGF-I depende de la activación de receptores de adenosina y metabotrópicos de glutamato, gliotransmisores que probablemente estén siendo liberados por los astrocitos. De hecho, es bien conocido que los astrocitos liberan ATP que se transforma en adenosina que activa receptores A_{2A} o A_1 de adenosina que potencian o deprimen la transmisión sináptica respectivamente (Martin-Fernandez et al., 2017). Asimismo, se ha demostrado que la activación de los receptores A_1 disminuyen la Pr y deprimen la transmisión sináptica en capa 4 de la corteza de barriles evocada por estimulación de las neuronas excitadoras del núcleo ventrobasal del tálamo (Fontanez and Porter, 2006). Además, se sabe que los astrocitos de la capa 2/3 de la corteza de barriles responden a la estimulación sináptica en capa 4 aumentando su calcio, siendo estos aumentos de calcio potenciados en presencia del antagonista de los receptores A_1 , CPT (Schipke et al., 2008). Por otro lado, se sabe que el glutamato liberado por los astrocitos induce STP de las EPSC en el hipocampo. Esta potenciación depende de la activación de los mGluR del grupo I en el terminal presináptico glutamatérgico (Navarrete and Araque, 2010). Cuando esta interacción coincide con la liberación postsináptica de NO, se genera una LTP de las EPSC (Gómez-Gonzalo et al., 2015). Asimismo, se ha observado in vivo que los astrocitos de la capa 2/3 de la corteza de barriles responden a la estimulación sensorial de las vibrisas, sincronizándose con los LFP a través de aumentos de calcio y siendo estos dependientes de la frecuencia de estimulación. De tal manera que la máxima actividad alcanzada por los astrocitos se consigue cuando se estimula la vibrisa a 5 Hz. Además, cuando se bloquean los mGluR del grupo I, disminuyen los aumentos de calcio en los astrocitos sin verse afectados los LFP (Wang et al., 2006).

Existen receptores de adenosina que establecen una relación sinérgica con los mGluR. Además, es probable que esta interacción entre receptores sea a través de la PKC (De Mendonça and Ribeiro, 1997), ya que la activación de la PKC por forbol ésteres o por proteína G acoplada a mGluR induce una disminución del efecto inhibitor sobre la liberación de glutamato por los receptores A_1 de adenosina (Budd and Nicholls, 2002). Adicionalmente, se ha demostrado una acción sinérgica entre los receptores A_{2A}

y mGluR del grupo I (1 y 5) modulando el receptor D2 de dopamina en el núcleo estriado (Ferré et al. 1999). Incluso la acción sinérgica entre ambos receptores induce un aumento en la liberación de glutamato por los terminales glutamatérgicos estriales (Pintor et al., 2000; Rodrigues et al., 2005). Interesantemente, se han encontrado heterómeros de A_{2A}-mGluR5 en cultivos del núcleo estriado de la rata transfectados con ambos receptores, lo que sustenta la cooperatividad entre ambos (Ferre et al., 2002).

Sorprendentemente cuando se bloquean los receptores de adenosina A₁ o los mGluR1 y 5, no solo se previene la STP de las EPSC sino que se induce una LTD presináptica de las EPSC por IGF-I. Dado que una LTD de las EPSC similar se observa al prevenir los aumentos de calcio citosólico en la neurona postsináptica con BAPTA, estos resultados podrían indicar que la activación de los receptores de adenosina A₁ y los mGluR1 y 5 postsinápticos, podrían ser necesarios para aumentar los niveles de calcio postsinápticos y liberar algún mensajero retrogrado que actuaría impidiendo la inducción de la LTD presináptica de las EPSC en condiciones control. Sin embargo, este tipo de plasticidad sináptica no ha sido abordada en esta tesis doctoral.

1.3 Modulación de la transmisión sináptica inhibitoria

Las acciones neuromoduladoras del IGF-I descritas en esta tesis no quedan restringidas a la transmisión sináptica excitadora, sino que el IGF-I es capaz de modular al mismo tiempo la transmisión sináptica inhibitoria. De hecho, IGF-I induce una LTD de las IPSC que no depende de aumentos de calcio postsináptico ni de la activación de los NMDAR y que es debida a una disminución en la Pr. Este resultado coincide con la LTD por disminución de la Pr de GABA inducida por IGF-I que ha sido observada en células de Purkinje en el cerebelo (Castro-Alamancos and Torres-Aleman, 1993).

La LTD de las IPSC inducida por IGF-I requiere la activación de los astrocitos y de los receptores de adenosina A_{2A} al igual que ocurría con la excitación. De hecho, el bloqueo de los A_{2A} no solo previene la LTD de las IPSC, sino que permite la aparición de una LTP de las IPSC. De modo que el mecanismo más plausible sería que los aumentos en la concentración de calcio citosólico en los astrocitos induzca la liberación de ATP

que actuaría a nivel de terminal presináptico gabaérgico reduciendo a largo plazo la Pr de GABA cuando se coactivan los receptores de IGF-I y los A_{2A} en el terminal gabaérgico. Sin embargo, IGF-I induciría la LTP de las IPSC cuando se activen los IGF-IR presinápticos en ausencia de activación de los A_{2A} (ej. cuando se bloquean los receptores A_{2A} presinápticos). Así, en el núcleo central de la amígdala, la liberación de eCBs desde la neurona postsináptica induce aumentos de calcio en los astrocitos adyacente a través de la activación de los CB1R. Estos aumentos de calcio producen la liberación de ATP/adenosina que actúa presinápticamente en los terminales gabaérgicos aumentando a largo plazo la Pr (Martin-Fernandez et al., 2017).

La LTD de las IPSC inducida por IGF-I ocurre de forma paralela a la STP de las EPSC y al aumento de la excitabilidad y la R_m , de modo que estas formas de plasticidad interaccionan y se reflejan en un aumento a largo plazo de la transmisión sináptica cuando se registran los PSP en las rodajas. Por lo tanto, el efecto neto del IGF-I en capa 2/3 de la corteza de barriles es excitador, siendo debido a la disminución a largo plazo de la transmisión sináptica inhibitoria sumado al aumento transitorio en las EPSC y al aumento de R_m .

1.4 Metaplasticidad inducida por IGF-I.

Los resultados expuestos hasta el momento muestran la versatilidad y complejidad de las acciones del IGF-I en fenómenos de transmisión sináptica. Además, se puede observar el elevado número de moléculas con las que interactúa, siendo de vital importancia una homeostasis para la regulación del sistema. De modo que, como hemos demostrado a nivel celular, el IGF-I podría tener una funcionalidad en procesos de memoria asociativa tanto in vitro como in vivo al inducir metaplasticidad, favoreciendo la plasticidad sináptica inducida por STDP. De acuerdo con estos resultados, se ha descrito un fenómeno de metaplasticidad en la corteza de barriles dependiente de NMDAR y reforzada por mGluR del grupo I (Clem et al., 2008). Además, también se ha relacionado a los astrocitos en este fenómeno, siendo importante no solo a nivel funcional, sino también en los cambios estructurales que ocurren en los procesos astrocitarios adyacentes a las dendritas tanto in vitro como in vivo.

vivo (Perez-Alvarez et al., 2014). Por tanto, es posible que la metaplasticidad inducida por IGF-I en los protocolos STDP sea dependiente de la actividad astrocitaria.

1.5 Efectos moduladores del IGF-I in vivo.

Asimismo, hemos demostrado con experimentos in vivo en el animal anestesiado que IGF-I es capaz de modular la transmisión sináptica. De tal modo que la aplicación local de IGF-I produce una LTP de los LFP que está ausente en ratones *knockout* para el IGF-IR en los astrocitos. Esto demuestra que la LTP inducida por IGF-I in vivo es dependiente de la activación de los IGF-IR en los astrocitos, poniendo de relevancia el papel clave de la activación astrocitaria inducida por IGF-I en esta corteza. Es más, nuestros resultados demuestran que esta LTP inducida in vivo requiere de la activación de los receptores A_{2A} , concordando con el requerimiento de la activación de estos receptores para inducir la LTD de las IPSC en rodajas. Por tanto, estos datos sugieren que la activación de los IGF-IR en los astrocitos podría inducir la liberación de ATP que actuaría induciendo la LTD de las IPSC que se reflejaría en una LTP de los LFP. Apoyando estas evidencias, se sabe que el receptor de insulina astrocitario (IR) está también implicado en la liberación de ATP por los astrocitos (Cai et al., 2018). Se ha descrito que esta liberación de ATP por los astrocitos induce un aumento en la Pr de dopamina por los terminales dopaminérgicos en el núcleo accumbens. En consecuencia, esta es la primera observación en la que se involucra directamente a los astrocitos en la modulación de la transmisión sináptica mediada por IGF-I.

1.6 Modelo de las acciones de IGF-I en capa 2/3 de la corteza de barriles.

Por tanto, y conforme a los resultados discutidos hasta el momento proponemos un posible modelo que explicaría la modulación de la transmisión sináptica excitadora e inhibidora por IGF-I y su efecto neto global en la inducción de la LTP de los LFP y el aumento de excitabilidad. En este modelo se incluiría:

- 1.- Un primer efecto postsináptico debido a la activación de los IGF-IR en la neurona postsináptica que induciría el aumento de resistencia de membrana debido al cierre de conductancias de potasio (ver paso 4 en el modelo propuesto en la figura 40) como por ejemplo la I_A (Nuñez et al., 2003).

2.- Un segundo efecto postsináptico en el que los aumentos de calcio citosólico en la neurona postsináptica inducidos en presencia de IGF-I y la activación de los receptores de adenosina (A_{2A} y A_1) son necesarios para inducir la STP de las EPSC, favorecida por la activación de los mGluRs. Aunque no tenemos datos que lo demuestren hemos situado estos receptores postsinápticamente por simplicidad.

Modelo de la inducción de la STP_{EPSC}

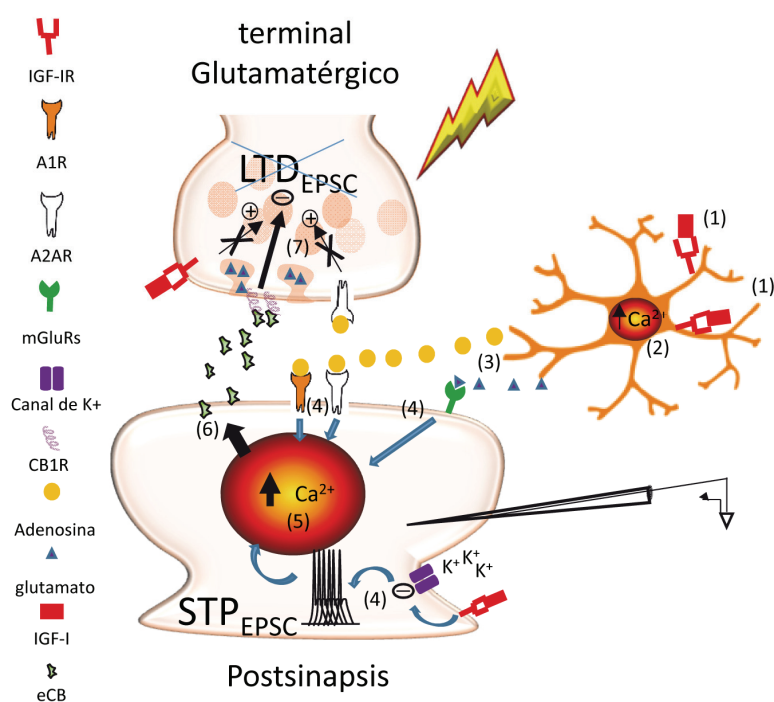


Figura 40. Modelo de un posible mecanismo de inducción de la STP de las EPSC. Modelo propuesto para la inducción de la STP de las EPSCs en el que el IGF-I interacciona con receptor en el astrocito (1) produciendo aumentos de calcio en éste (2), lo que desencadena la liberación de ATP/adenosina y glutamato (3). Ambos gliotransmisores interaccionan con sus receptores en la neurona postsináptica (A_1 , A_{2A} y mGluR1 y 5) y junto con el bloqueo de canales de potasio mediado por el IGF-IR postsináptico (4), desencadenan un incremento de calcio postsináptico (5) que produce la liberación de eCBs (6). Estos mensajeros retrógrados se unen a su receptor en el terminal presináptico que actúa como freno en la inducción de la LTD de las EPSCs presináptica (7), lo que conduce a la expresión de la STP de las EPSCs postsináptica. Nótese que para simplificar el modelo no se han representado los receptores inotrópicos glutamatergicos en la postsinapsis cuya activación por el glutamato liberado desde la presinapsis genera las EPSCs en la neurona postsináptica (igual ocurre en el modelo de la figura 41).

3.- Un tercer efecto presináptico, donde IGF-I induce la LTD de las EPSC, que aparece cuando aumentan los niveles de IGF-I pero o bien no ocurren aumentos de calcio postsináptico (por estar hiperpolarizada la neurona postsináptica) o bien los receptores de adenosina A_1 y/o mGluR no se activan. En este caso, aunque no tenemos resultados experimentales que lo sustenten, una posible explicación para que esta LTD estuviera ausente en condiciones control y apareciera en estas condiciones especiales, sería que en control los aumentos de calcio postsinápticos junto con la activación de receptores de adenosina A_1 y mGluR podría estar induciendo la liberación de un mensajero retrogrado (e.j, los eCB) que estuviera impidiendo la inducción de la LTD presináptica. En el momento que no hay aumentos de calcio postsinápticos y/o activación de los receptores de adenosina A_1 y/o mGluR no se induciría la STP de las EPSC ni se liberaría suficiente mensajero retrogrado de forma que se induciría la LTD de las EPSC.

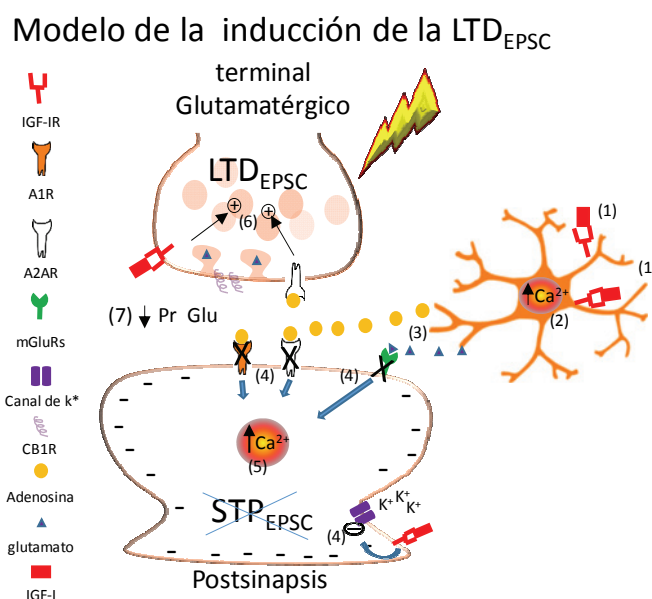


Figura 41. Modelo de un posible mecanismo de inducción de la LTD de las EPSC. Modelo propuesta para la inducción de la LTDP de las EPSCs en el que el IGF-I interacciona con receptor en el astrocito (1) produciendo aumentos de calcio en éste (2), lo que puede desencadenar la liberación de ATP/adenosina y glutamato (3). Si alguno de los gliotransmisores no es liberado o no interacciona con sus receptores en la neurona postsináptica (A_1 , A_{2A} y mGluR1 y 5) y/o la neurona postsináptica está hiperpolarizada (4), no se produce un incremento de calcio postsináptico suficiente (5) como para que se induzca la liberación de eCBs. En este escenario donde no se activan los CB1R presinápticos, la activación de los receptores de adenosina A_{2A} y el IGF-IR presinápticos induce la LTD de las EPSCs presináptica (6) a través de la disminución de la probabilidad de liberación de glutamato (7).

4.- Un cuarto y último efecto presináptico, en el que la activación de los IGF-IR en los astrocitos libera adenosina que activa los receptores de A_{2A} en los terminales gabaérgicos induciendo una LTD de las IPSC por disminución a largo plazo de la Pr de GABA.

Modelo de la inducción de la LTD_{IPSC}

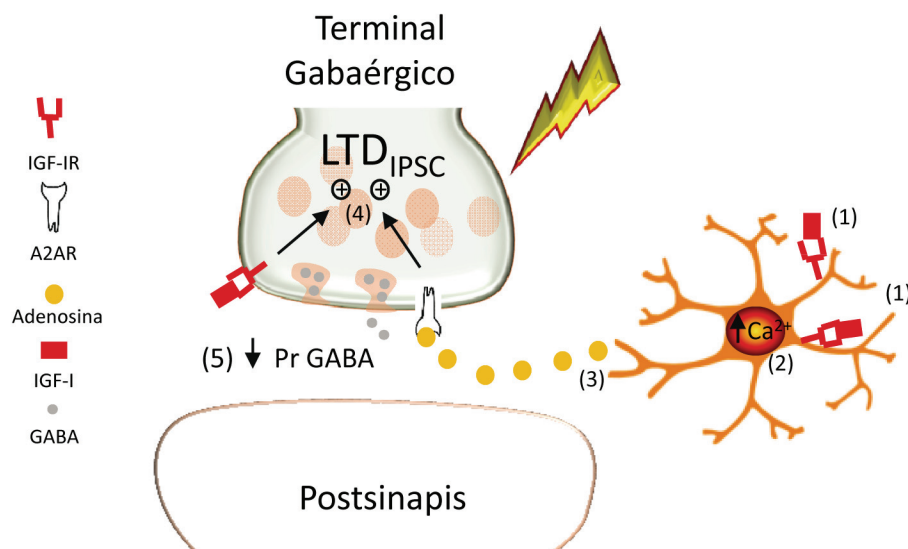


Figura 42. Modelo de un posible mecanismo de inducción de la LTD de las IPSC. Modelo propuesta para la inducción de la LTDP de las EPSCs en el que el IGF-I activa a sus receptores en el astrocito (1) produciendo aumentos de calcio en éste (2), lo que desencadena la liberación de ATP/adenosina (3). La activación de los receptores A_{2A} y de los IGF-IR en el terminal gabaérgico inducen la LTD de las IPSCs (4) a través de la disminución de la probabilidad de liberación de GABA (5). Nótese que para simplificar el modelo no se han representado los receptores gabaérgicos en la postsinapsis cuya activación por el GABA liberado desde la presinapsis genera las IPSCs en la neurona postsináptica.

2. Modulación de la actividad de la corteza de infralímbica y su relación con la modulación del miedo condicionado por IGF-I

La importancia de los trastornos asociados al miedo y la ansiedad (trastorno de estrés post-traumático, ansiedad generalizada, fobias etc.) radica en que son los desórdenes psiquiátricos más generalizados. Son padecidos por 264 millones de personas en el mundo, lo que supone un 14.9% de incremento desde 2005 a 2015

según la OMS (Organización Mundial de la Salud). Estos trastornos mentales comunes conducen a considerables pérdidas en la salud y bienestar de los individuos de la población. Por tanto, suponen cifras millonarias como coste de estas enfermedades sumado a los efectos colaterales derivados de estas. La mPFC interviene en procesos emocionales como es el miedo condicionado. Además, la corteza IL, que se encuentra en la porción ventral de la mPFC, modula la extinción del miedo condicionado (Milad and Quirk, 2002). Un estudio reciente ha asociado la disminución de los niveles de expresión del IGF-IR en la PFC durante el miedo condicionado cuando se dan exposiciones agudas a un predador (Ogundele et al., 2017). Además, los niveles de IGF-I en la mPFC han sido relacionados con la ansiedad asociada a la diabetes mellitus (Aksu et al., 2012). Por tanto, las evidencias apuntan a que IGF-I podría estar modulando la respuesta del miedo condicionado. En esta tesis hemos demostrado que efectivamente la aplicación de IGF-I en la IL mejora la memoria de extinción del miedo. Al analizar los efectos sobre las propiedades eléctricas de las neuronas piramidales de capa 5 hemos observado que aumenta su excitabilidad y se reducen las corrientes de potasio activadas por calcio de cinética lenta (sl_{AHP}). Además, hemos demostrado que IGF-I produce LTD tanto de las EPSC como de las IPSC, ambas mediadas por la disminución a largo plazo en Pr, resultando en una LTP de los PSP y, probablemente, en un aumento de la salida de información de esta corteza a la amígdala.

2.1. IGF-I facilita la memoria de extinción del miedo condicionado

Los trabajos previos publicados en la literatura muestran cómo la inducción de la LTP en la corteza infralímbica es clave en el recuerdo de la memoria de extinción. Por ello comenzamos a estudiar los posibles efectos del IGF-I en el recuerdo de la memoria de extinción, planteando como hipótesis de partida que si IGF-I era capaz de inducir LTP de los PSP en esta corteza al igual que hace en la corteza de barriles, sería esperable una mejora en la memoria de extinción. Efectivamente en esta tesis hemos podido comprobar que la aplicación de IGF-I en la corteza infralímbica 30 minutos antes de inducir la memoria de extinción, facilita esta memoria y su recuerdo al día siguiente, corroborando después que IGF-I induce una LTP de los PSP en las neuronas de capa 5 de la corteza infralímbica. Esta es la primera investigación que a día de hoy

ha analizado el efecto de aumentar los niveles de IGF-I en la corteza infralímbica y su papel en el miedo condicionado. Aunque la forma de aumentar los niveles de IGF-I en la corteza IL en esta tesis ha sido por aplicación exógena, queda por analizar los posibles mecanismos fisiológicos que podrían aumentar de manera similar los niveles de IGF-I, permitiendo mejorar la memoria de extinción del miedo condicionado. Desde este punto de vista cabría esperar que determinados patrones de actividad eléctrica que inducen la liberación de IGF-I desde los astrocitos y las neuronas (Nishijima et al., 2010) fueran claves en estos mecanismos fisiológicos. Además, habría que tener en cuenta la modulación de los niveles de IGF-I periférico y su ingreso en el SNC mediado por actividad, siendo todos estos aspectos claves para producir aumentos en los niveles de IGF-I similares a los usados en esta tesis, pero en condiciones más fisiológicas.

2.2. IGF-I aumenta la excitabilidad y reduce las sl_{AHP}

Diferentes investigaciones han demostrado que las neuronas piramidales de IL están ejerciendo una acción muy importante en la generación de la memoria de extinción del miedo condicionado. Así, se ha observado que la memoria de extinción del miedo condicionado requiere los aumentos en la excitabilidad de las neuronas piramidales de la IL tanto in vivo como in vitro (Lebrón et al., 2004; Santini et al., 2012). Un amplio número de investigaciones han demostrado que la extinción del miedo condicionado produce una reducción de las sl_{AHP} en neuronas de la IL. En homología con estos resultados, nosotros demostramos que el IGF-I reduce la sl_{AHP} y aumenta la excitabilidad de las neuronas piramidales de capa 5 de la IL, mejorando la memoria de extinción del miedo condicionado. Asimismo, diversas investigaciones han descrito que tanto la activación de los mGluR5, como de los receptores muscarínicos de acetilcolina aumentan la excitabilidad y disminuyen la sl_{AHP} mejorando la memoria de extinción (Santini et al., 2008); Fontanez-Nuin et al., 2011; Santini et al., 2012).

2.3. IGF-I induce LTD de las EPSC e IPSC resultando en una LTP de los PSP

Por otro lado, se ha demostrado que durante la generación de la memoria de extinción del miedo condicionado se induce una LTP de los PSP dependiente de la

activación de los mGluR5 en las neuronas piramidales de la IL (Sepulveda-Orengo et al., 2013). De acuerdo con nuestros resultados, el IGF-I es capaz de modular la transmisión sináptica excitadora e inhibidora, traducándose en una LTP de los PSP en rodajas. Además, en las ratas que fueron inyectadas con IGF-I localmente en la IL, la memoria de extinción del miedo condicionado se facilitó, así como el recuerdo 24 h después. Esta facilitación estuvo ausente tanto en las ratas tratadas con salino como en las tratadas con el IGF-I más el antagonista de los IGF-IR. De igual manera, demostramos en rodajas que el IGF-I disminuye tanto la transmisión sináptica gabaérgica como las sl_{AHP} sin necesidad de estimular las sinapsis o activar las sl_{AHP} , lo que nos estaría indicando que tiene la capacidad de producir plasticidad tanto sináptica como intrínseca con solo aumentar sus niveles. Esta plasticidad inducida por IGF-I podría aumentar la salida de información de la IL mejorando así la formación de la memoria de extinción. De acuerdo con esta hipótesis, Sierra-Mercado y cols. mostraron que cuando la IL se inactiva por muscimol empeora la formación de la memoria de extinción, así como el *freezing*. Otros estudios más recientes llevados a cabo con métodos optogenéticos y con trazadores demuestran que un incremento en la actividad de IL facilita la formación de la extinción. Por otro lado, estos estudios también demuestran que cuando la IL se inactiva previo recuerdo de la extinción por métodos optogenéticos, no se ven afectados los niveles de *freezing* respecto a los animales controles. Por tanto, la IL sería necesaria para la formación de la memoria de extinción del miedo condicionado, ya que durante la adquisición estaría produciendo plasticidad en las neuronas del BLA a las que proyecta, siendo estos cambios los que mantendrían los niveles de *freezing* bajos aun cuando la IL pudiera dañarse (Sierra-Mercado et al., 2011; Do-Monte et al., 2015; Bloodgood et al., 2018).

Existe controversia entre los resultados existentes respecto al papel modulador de la IL en la adquisición y consolidación de la memoria de extinción del miedo condicionado. Tal es así que se podrían clasificar dos vertientes en función de los resultados obtenidos hasta la fecha. Por un lado, es sostenido que la corteza IL solo interviene durante la consolidación de la extinción (Santini et al., 2008; Santini and Porter, 2010; Fontanez-Nuin et al., 2011). Sin embargo, otra vertiente más reciente

defiende que además participa en la facilitación de la adquisición de la memoria de extinción (Sierra-Mercado et al., 2011; Do-Monte et al., 2015; Bloodgood et al., 2018). Nuestros resultados muestran que el IGF-I facilita la formación de la memoria de extinción, así como disminuye los niveles de *freezing*. Esta problemática debe ser analizada en profundidad y contrastando las posibles diferencias en las condiciones experimentales que puedan justificar esta controversia.

VI. CONCLUSIONES

1. IGF-I incrementa la excitabilidad y la resistencia de membrana de las neuronas piramidales de la capa 2/3 de la corteza de barriles del ratón.
2. El IGF-I induciendo la LTD de las IPSC y la STP de las EPSC. Sin embargo, induce la LTD de las EPSC cuando los aumentos de calcio citosólico postsinápticos son prevenidos.
3. Estas formas de plasticidad sináptica inducidas por IGF-I son dependientes de aumentos de calcio astrocitario. De hecho, IGF-I aumenta la frecuencia de eventos espontáneos de calcio citosólico astrocitario.
4. La LTD de las EPSC y la LTD de las IPSC necesitan la activación de los receptores de adenosina A_{2A} , mientras que la STP de las EPSC requiere además la activación de los receptores A_1 y mGluR del grupo I.
5. El IGF-I genera una LTP de los PSP independiente de la estimulación sináptica.
6. IGF-I produce metaplasticidad, ya que la LTP de los PSP por IGF-I favorece la inducción de plasticidad sináptica inducida por STDP.
7. IGF-I aplicado localmente en animales anestesiados induce una LTP de los LFP dependiente de los IGF-IR en astrocitos y de la activación de los receptores A_{2A} de adenosina.
8. La LTP de los LFP por IGF-I en animales anestesiados favorece la inducción de LTP dependiente de activación de los NMDAR.
9. La aplicación local de IGF-I en la corteza infralímbica facilita la memoria de extinción del miedo condicionado.
10. El IGF-I induce un aumento de la excitabilidad y de la Rm en neuronas piramidales de capa 5 de la corteza infralímbica, así como una disminución a largo plazo de la sl_{AHP} .
11. IGF-I induce LTD tanto de las corrientes sinápticas excitadoras como inhibitoras de las neuronas piramidales de la capa 5 de la corteza infralímbica, reflejándose en una LTP de los PSP.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abraham WC, Bear MF (1996) Metaplasticity. *Trends in Neurosciences* 19:126–130.
- Aksu I, Ates M, Baykara B, Kiray M, Sisman AR, Buyuk E, Baykara B, Cetinkaya C, Gumus H, Uysal N (2012) Anxiety correlates to decreased blood and prefrontal cortex IGF-1 levels in streptozotocin induced diabetes. *Neuroscience Letters* 531:176–181.
- Alloway KD (2008) Information processing streams in rodent barrel cortex: The differential functions of barrel and septal circuits. *Cerebral Cortex* 18:979–989.
- Álvarez Z, Hyroššová P, Perales JC, Alcántara S (2016) Neuronal Progenitor Maintenance Requires Lactate Metabolism and PEPCCK-M-Directed Cataplerosis. *Cerebral Cortex* 26:1046–1058.
- Amorapanth P, LeDoux JE, Nader K (2000) Different lateral amygdala outputs mediate reactions and actions elicited by a fear-arousing stimulus. *Nature Neuroscience* 3:74–79.
- Andrade-Talavera Y, Duque-Feria P, Paulsen O, Rodríguez-Moreno A (2016) Presynaptic Spike Timing-Dependent Long-Term Depression in the Mouse Hippocampus. *Cerebral Cortex* 26:3637–3654.
- Anglada-Figueroa and QuirkJ. (2005) Lesions of the Basal Amygdala Block Expression of Conditioned Fear But Not Extinction. *Journal of Neuroscience* 25:9680–9685.
- Annunziata M, Granata R, Ghigo E (2011) The IGF system. *Acta Diabetologica* 48:1–9.
- Arabzadeh E, Zorzin E, Diamond ME (2005) Neuronal Encoding of Texture in the Whisker Sensory Pathway Meister M, ed. *PLoS Biology* 3:e17.
- Araque A, Carmignoto G, Haydon PG (2001) Dynamic Signaling Between Astrocytes and Neurons. *Annual Review of Physiology* 63:795–813.
- Araque A, Carmignoto G, Haydon PG, Oliet SHR, Robitaille R, Volterra A (2014) Gliotransmitters travel in time and space. *Neuron* 81:728–739.
- Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG (1999) Tripartite synapses: Glia, the unacknowledged partner. *Trends in Neurosciences* 22:208–215.

- Arsenijevic Y, Weiss S (1998) Insulin-Like Growth Factor-I Is a Differentiation Factor for Postmitotic CNS Stem Cell-Derived Neuronal Precursors: Distinct Actions from Those of Brain-Derived Neurotrophic Factor. *The Journal of Neuroscience* 18:2118–2128.
- Baffa R1, Reiss K, El-Gabry EA, Sedor J, Moy ML, Shupp-Byrne D, Strup SE, Hauck WW, Baserga R GL (2000) Low serum insulin-like growth factor 1 (IGF-1): A significant association with prostate cancer. *Techniques in Urology* 6:236–239.
- Baker JD, Azorlosa JL (1996) The NMDA antagonist MK-801 blocks the extinction of Pavlovian fear conditioning. *Behavioral Neuroscience* 110:618–620.
- Ballotti R, Nielsen FC, Pringle N, Kowalski A, Richardson WD, Van Obberghen E GS (1987) Insulin-like growth factor I in cultured rat astrocytes: expression of the gene, and receptor tyrosine kinase. *The EMBO Journal* 6:3633–3639.
- Banerjee A, Meredith RM, Rodríguez-Moreno A, Mierau SB, Auberson YP, Paulsen O (2009) Double dissociation of spike timing-dependent potentiation and depression by subunit-preferring NMDA receptor antagonists in mouse barrel cortex. *Cerebral Cortex* 19: 2959–2969.
- Barros-Zulaica N, Castejon C, Nuñez A (2014) Frequency-specific response facilitation of supra and infragranular barrel cortical neurons depends on NMDA receptor activation in rats. *Neuroscience* 281:178–194.
- Bellini MJ, Hereñú CB, Goya RG, Garcia-Segura LM (2011) Insulin-like growth factor-I gene delivery to astrocytes reduces their inflammatory response to lipopolysaccharide. *Journal of Neuroinflammation* 8:21.
- Betz WJ (1970) Depression of transmitter release at the neuromuscular junction of the frog. *The Journal of Physiology* 206:629–644.
- Bi G, Poo M (2001) Synaptic Modification by Correlated Activity: Hebb's Postulate Revisited. *Annual Review of Neuroscience* 24:139–166.
- Blanchard DC, Blanchard RJ (1972) Innate and conditioned reactions to threat in rats

- with amygdaloid lesions. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 81:281–290.
- Bliss TVP, Lømo T (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of Physiology* 232:331–356.
- Bloodgood DW, Sugam JA, Holmes A, Kash TL (2018) Fear extinction requires infralimbic cortex projections to the basolateral amygdala. *Translational Psychiatry* 8:60.
- Blundell TL, Bedarkar S, Humbel RE (1983) Tertiary structures, receptor binding, and antigenicity of insulinlike growth factors. *Federation Proceedings* 42:2592-2597.
- Brodal A (1947) The amygdaloid nucleus in the rat. *Journal of Comparative Neurology* 87:1–16.
- Brooker GJF, Kalloniatis M, Russo VC, Murphy M, Werther GA, Bartlett PF (2000) Endogenous IGF-1 regulates the neuronal differentiation of adult stem cells. *Journal of Neuroscience Research* 59:332–341.
- Budd DC, Nicholls DG (2002) Protein Kinase C-Mediated Suppression of the Presynaptic Adenosine A1 Receptor by a Facilitatory Metabotropic Glutamate Receptor. *Journal of Neurochemistry* 65:615–621.
- Cai W, Xue C, Sakaguchi M, Konishi M, Shirazian A, Ferris HA, Li ME, Yu R, Kleinridders A, Pothos EN, Kahn CR (2018) Insulin regulates astrocyte gliotransmission and modulates behavior. *Journal of Clinical Investigation* 128:2914–2926.
- Cain CK, Blouin AM, Barad M (2002) L-type voltage-gated calcium channels are required for extinction, but not for acquisition or expression, of conditional fear in mice. *The Journal of Neuroscience* 22:9113–9121.
- Campbell CBG, Hodos W (1970) The concept of homology and the evolution of the nervous system. *Brain, Behavior and Evolution* 3:353–367.
- Cao P, Maximov A, Südhof TC (2011) Activity-dependent IGF-1 exocytosis is controlled

- by the Ca²⁺-sensor synaptotagmin-10. *Cell* 145:300–311.
- Cao P, Yang X, Sudhof TC (2013) Complexin Activates Exocytosis of Distinct Secretory Vesicles Controlled by Different Synaptotagmins. *Journal of Neuroscience* 33:1714–1727.
- Carmignoto G, Vicini S (1992) Activity-dependent decrease in NMDA receptor responses during development of the visual cortex. *Science* 258:1007–1011.
- Carro E (2005) Choroid Plexus Megalin Is Involved in Neuroprotection by Serum Insulin-Like Growth Factor I. *Journal of Neuroscience* 25:10884–10893.
- Carro E, Nuñez A, Busiguina S, Torres-Aleman I (2000) Circulating insulin-like growth factor I mediates effects of exercise on the brain. *Trends in Neurosciences* 29:474–480.
- Carro E, Torres-Aleman I (2004) Insulin-like growth factor I and Alzheimer's disease: Therapeutic prospects? *Expert Review of Neurotherapeutics* 4:79–86.
- Castro-Alamancos MA, Torres-Aleman I (1993) Long-term depression of glutamate-induced gamma-aminobutyric acid release in cerebellum by insulin-like growth factor I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82:11–20.
- Chapman PF, Kairiss EW, Keenan CL, Brown TH (1990) Long-Term synaptic potentiation in the amygdala. *Synapse* 6:271–278.
- Cheng B, Mattson M (1992) IGF-I and IGF-II protect cultured hippocampal and septal neurons against calcium-mediated hypoglycemic damage. *Journal of Neuroscience* 12:1558–1566.
- Chhatwal JP, Myers KM, Ressler KJ, Davis M (2005) Regulation of Gephyrin and GABA_A Receptor Binding within the Amygdala after Fear Acquisition and Extinction. *Journal of Neuroscience* 25:502–506.
- Christie BR, Abraham WC (1992) Priming of associative long-term depression in the dentate gyrus by θ frequency synaptic activity. *Neuron* 9:79–84.

- Citri A, Malenka RC (2008) Synaptic plasticity: Multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 33:18–41.
- Clem RL, Celike T, Barth AL (2008) Ongoing in vivo experience triggers synaptic metaplasticity in the neocortex. *Science* 319:101–104.
- Clements JD (1990) A statistical test for demonstrating a presynaptic site of action for a modulator of synaptic amplitude. *Journal of Neuroscience Methods* 31:75–88.
- Cohen AS, Coussens CM, Raymond CR, Abraham WC (1999) Long-lasting increase in cellular excitability associated with the priming of LTP induction in rat hippocampus. *J Neurophysiol* 82:3139–3148.
- Collins DR (2000) Differential Fear Conditioning Induces Reciprocal Changes in the Sensory Responses of Lateral Amygdala Neurons to the CS+ and CS-. *Learning & Memory* 7:97–103.
- Corcoran K a, Maren S (2001) Hippocampal inactivation disrupts contextual retrieval of fear memory after extinction. *The Journal of neuroscience* 21:1720–1726.
- Costantini C, Lorenzetto E, Cellini B, Buffelli M, Rossi F, Della-Bianca V (2010) Astrocytes regulate the expression of insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1-R) in primary cortical neurons during in vitro senescence. *Journal of Molecular Neuroscience* 40:342–352.
- Cousens G, Otto T (1998) Both pre- and posttraining excitotoxic lesions of the basolateral amygdala abolish the expression of olfactory and contextual fear conditioning. *Behavioral Neuroscience* 112:1092–1103.
- Covelo A, Araque A (2016) Lateral regulation of synaptic transmission by astrocytes. *Neuroscience* 323:62–66.
- Covelo A, Araque A (2018) Neuronal activity determines distinct gliotransmitter release from a single astrocyte. *eLife* 7:e32237.
- D’Ercole AJ, Stiles AD, Underwood LE (1984) Tissue concentrations of somatomedin C: further evidence for multiple sites of synthesis and paracrine or autocrine

- mechanisms of action. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81:935–939.
- De Mendonça A, Ribeiro JA (1997) Influence of metabotropic glutamate receptor agonists on the inhibitory effects of adenosine A1receptor activation in the rat hippocampus. *British Journal of Pharmacology* 121:1541–1548.
- de Sevilla DF, Nunez A, Borde M, Malinow R, Buno W (2008) Cholinergic-Mediated IP3-Receptor Activation Induces Long-Lasting Synaptic Enhancement in CA1 Pyramidal Neurons. *Journal of Neuroscience* 28:1469–1478.
- Debanne D, Guérineau NC, Gähwiler BH, Thompson SM (1996) Paired-pulse facilitation and depression at unitary synapses in rat hippocampus: quantal fluctuation affects subsequent release. *The Journal of Physiology* 491:163–176.
- DeFelipe J, Fariñas I (1992) The pyramidal neuron of the cerebral cortex: Morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. *Progress in Neurobiology* 39:563–607.
- Desai NS, Cudmore RH, Nelson SB, Turrigiano GG (2002) Critical periods for experience-dependent synaptic scaling in visual cortex. *Nature Neuroscience* 5:783–789.
- Di Castro MA, Chuquet J, Liaudet N, Bhaukaurally K, Santello M, Bouvier D, Tiret P, Volterra A (2011) Local Ca²⁺-detection and modulation of synaptic release by astrocytes. *Nature Neuroscience* 14:1276–1284.
- Do-Monte FH, Manzano-Nieves G, Quinones-Laracuente K, Ramos-Medina L, Quirk GJ (2015) Revisiting the Role of Infralimbic Cortex in Fear Extinction with Optogenetics. *Journal of Neuroscience* 35:3607–3615.
- Egger V, Feldmeyer D, Sakmann B (1999) Coincidence detection and changes of synaptic efficacy in spiny stellate neurons in rat barrel cortex. *Nature Neuroscience* 2:1098–1105.
- Erzurumlu RS (2010) Critical period for the whisker-barrel system. *Experimental Neurology* 222:10–12.

- Falls WA, Miserendino MJD, Davis M (1992) Extinction of Fear-potentiated Startle: Blockade by Infusion of an NMDA Antagonist into the Amygdala. *The Journal of Neuroscience* 12:854–963.
- Farinelli M, Deschaux O, Hugues S, Thevenet A, Garcia R (2006) Hippocampal train stimulation modulates recallof fear extinction independently of prefrontalcortex synaptic plasticity and lesions. *Learning & Memory* 13:329–334.
- Feldman DE (2009) Synaptic Mechanisms for Plasticity in Neocortex. *Annual Review of Neuroscience* 32:33–55.
- Feldmeyer D (2012) Excitatory neuronal connectivity in the barrel cortex. *Frontiers in Neuroanatomy* 6:24.
- Fernandez AM, Torres-Alemán I (2012) The many faces of insulin-like peptide signalling in the brain. *Nature Reviews Neuroscience* 13:225–239.
- Fernandez de Sevilla D, Fuenzalida M, Porto Pazos AB, Buno W (2007) Selective Shunting of the NMDA EPSP Component by the Slow Afterhyperpolarization in Rat CA1 Pyramidal Neurons. *Journal of Neurophysiology* 97:3242–3255.
- Ferre S, Karcz-Kubicha M, Hope BT, Popoli P, Burgueno J, Gutierrez MA, Casado V, Fuxe K, Goldberg SR, Lluís C, Franco R, Ciruela F (2002) Synergistic interaction between adenosine A2A and glutamate mGlu5 receptors: Implications for striatal neuronal function. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99:11940–11945.
- Floyd NS, Price JL, Ferry AT, Keay KA, Bandler R (2000) Orbitomedial prefrontal cortical projections to distinct longitudinal columns of the periaqueductal gray in the rat. *Journal of Comparative Neurology* 422:556–578.
- Foili F, Bonfanti L, Renard E, Ronald C (1994) Insulin Receptor Substrate-I Nervous System (IRS-I) Distribution in the Rat Central I--. *The journal of neuroscience* 58:171–177.
- Fontanez-Nuin DE, Santini E, Quirk GJ, Porter JT (2011) Memory for fear extinction requires mGluR5-mediated activation of infralimbic neurons. *Cerebral Cortex*

21:727–735.

Fontanez DE, Porter JT (2006) Adenosine A1 receptors decrease thalamic excitation of inhibitory and excitatory neurons in the barrel cortex. *Neuroscience* 137:1177–1184.

Gabbott PLA, Warner TA, Busby SJ (2006) Amygdala input monosynaptically innervates parvalbumin immunoreactive local circuit neurons in rat medial prefrontal cortex. *Neuroscience* 139:1039–1048.

Garcia R, Chang C, Maren S (2006) Electrolytic lesions of the medial prefrontal cortex do not interfere with long-term memory of extinction of conditioned fear. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, NY)* 13:14–17.

Gazit N, Vertkin I, Shapira I, Helm M, Slomowitz E, Sheiba M, Mor Y, Rizzoli S, Slutsky I (2016) IGF-1 Receptor Differentially Regulates Spontaneous and Evoked Transmission via Mitochondria at Hippocampal Synapses. *Neuron* 89:583–597.

Genis L, Dávila D, Fernandez S, Pozo-Rodrigálvarez A, Martínez-Murillo R, Torres-Aleman I (2014) Astrocytes require insulin-like growth factor I to protect neurons against oxidative injury. *F1000Research* 3:28.

Gómez-Gonzalo M, Navarrete M, Perea G, Covelo A, Martín-Fernández M, Shigemoto R, Luján R, Araque A (2015) Endocannabinoids induce lateral long-term potentiation of transmitter release by stimulation of gliotransmission. *Cerebral Cortex* 25:3699–3712.

Goosens KA, Hobin JA, Maren S (2003) Auditory-Evoked Spike Firing in the Lateral Amygdala and Pavlovian Fear Conditioning: Mnemonic Code or Fear Bias? *Neuron* 40:1013–1022.

Grimberg A, Cohen P (2000) Role of insulin-like growth factors and their binding proteins in growth control and carcinogenesis. *Journal of Cellular Physiology* 183:1–9.

Haidarliu S (2008) Lemniscal and extralemniscal compartments in the VPM of the rat.

- Frontiers in Neuroanatomy 2:4.
- Hatten ME, Mason CA (1990) Mechanisms of glial-guided neuronal migration in vitro and in vivo. *Experientia* 46:907–916.
- Haydon PG (2006) Astrocyte Control of Synaptic Transmission and Neurovascular Coupling. *Physiological Reviews* 86:1009–1031.
- Hebb (1949a) The first stage of perception: growth of the assembly. In: *The organization of behavior*.
- Hebb DO (1949b) *The Organization of Behavior: A Neuropsychological Approach*. In: *The Organization of Behavior*, pp 335.
- Henneberger C, Papouin T, Oliet SHR, Rusakov DA (2010) Long-term potentiation depends on release of d-serine from astrocytes. *Nature* 463:232–236.
- Hernandez-Garzón E, Fernandez AM, Perez-Alvarez A, Genis L, Bascuñana P, Fernandez de la Rosa R, Delgado M, Angel Pozo M, Moreno E, McCormick PJ, Santi A, Trueba-Saiz A, Garcia-Caceres C, Tschöp MH, Araque A, Martin ED, Torres Aleman I (2016) The insulin-like growth factor I receptor regulates glucose transport by astrocytes. *GLIA* 64:1962–1971.
- Hoover WB, Vertes RP (2007) Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat. *Brain Structure and Function* 212:149–179.
- Huang YY, Colino A, Selig DK, Malenka RC (1992) The influence of prior synaptic activity on the induction of long-term potentiation. *Science* 255:730–733 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1346729>.
- Jones EG (1994) Santiago Ramón y Cajal and the Croonian Lecture, March 1894. *Trends in Neurosciences* 17:190–192.
- Jones JI, Clemmons DR (1995) Insulin-like growth factors and their binding proteins: Biological actions. *Endocrine Reviews* 16:3–34.
- Jourdain P, Bergersen LH, Bhaukaurally K, Bezzi P, Santello M, Domercq M, Matute C, Tonello F, Gundersen V, Volterra A (2007) Glutamate exocytosis from astrocytes

- controls synaptic strength. *Nature Neuroscience* 10:331–339.
- Jung HJ, Suh Y (2015) Regulation of IGF -1 signaling by microRNAs. *Frontiers in Genetics* 5:472.
- Kang J, Jiang L, Goldman SA, Nedergaard M (1998) Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nature Neuroscience* 1:683–692.
- Kar S, Seto D, Doré S, Hanisch U, Quirion R (1997) Insulin-like growth factors-I and -II differentially regulate endogenous acetylcholine release from the rat hippocampal formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:14054–14059.
- Katz B, Miledi R (1968) The role of calcium in neuromuscular facilitation. *The Journal of Physiology* 195:481–492.
- Kesner RP, Churchwell JC (2011) An analysis of rat prefrontal cortex in mediating executive function. *Neurobiology of Learning and Memory* 96:417–431.
- Komoly S, Hudson LD, Webster HD, Bondy C a (1992) Insulin-like growth factor I gene expression is induced in astrocytes during experimental demyelination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89:1894–1898.
- Lebrón K, Milad MR, Quirk GJ (2004) Delayed recall of fear extinction in rats with lesions of ventral medial prefrontal cortex. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, NY)* 11:544–548.
- LeDoux JE (1995) Emotion: Clues from the Brain. *Annual Review of Psychology* 46:209–235.
- LeDoux JE (2009) Emotion Circuits in the Brain. *FOCUS* 7:274–274.
- Lee WH, Wang GM, Yang XL, Seaman LB, Vannucci SI (1999) Perinatal hypoxia-ischemia decreased neuronal but increased cerebral vascular endothelial IGFBP3 expression. *Endocrine* 11:181–188.
- Lin C-H, Yeh S-H, Lu H-Y, Gean P-W (2003) The similarities and diversities of signal

- pathways leading to consolidation of conditioning and consolidation of extinction of fear memory. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23:8310–8317.
- Little JP, Carter AG (2012) Subcellular Synaptic Connectivity of Layer 2 Pyramidal Neurons in the Medial Prefrontal Cortex. *Journal of Neuroscience* 32:12808–12819.
- Little JP, Carter AG (2013) Synaptic Mechanisms Underlying Strong Reciprocal Connectivity between the Medial Prefrontal Cortex and Basolateral Amygdala. *Journal of Neuroscience* 33:15333–15342.
- Logan S, Pharaoh GA, Marlin MC, Masser DR, Matsuzaki S, Wronowski B, Yeganeh A, Parks EE, Premkumar P, Farley JA, Owen DB, Humphries KM, Kinter M, Freeman WM, Szweda LI, Van Remmen H, Sonntag WE (2018) Insulin-like growth factor receptor signaling regulates working memory, mitochondrial metabolism, and amyloid- β uptake in astrocytes. *Molecular Metabolism* 9:141–155.
- Lu KT, Walker DL, Davis M (2001) Mitogen-activated protein kinase cascade in the basolateral nucleus of amygdala is involved in extinction of fear-potentiated startle. *The Journal of Neuroscience* 21:RC162.
- Madathil SK, Carlson SW, Brelsfoard JM, Ye P, D’Ercole AJ, Saatman KE (2013) Astrocyte-Specific Overexpression of Insulin-Like Growth Factor-1 Protects Hippocampal Neurons and Reduces Behavioral Deficits following Traumatic Brain Injury in Mice. *PLoS ONE* 8:e67204.
- Magleby KL, Zengel JE (1976) Augmentation: A process that acts to increase transmitter release at the frog neuromuscular junction. *The Journal of Physiology* 257:449–470.
- Maren S, Aharonov G, Fanselow MS (1996) Retrograde abolition of conditional fear after excitotoxic lesions in the basolateral amygdala of rats: Absence of a temporal gradient. *Behavioral Neuroscience* 110:718–726.
- Maren S, Fanselow MS (1996) The amygdala and fear conditioning: Has the nut been

- cracked? *Neuron* 16:237–240.
- Markram H et al. (2015) Reconstruction and Simulation of Neocortical Microcircuitry. *Cell* 163:456–492.
- Markram H, Lübke J, Frotscher M, Sakmann B (1997) Regulation of synaptic efficacy by coincidence of postsynaptic APs and EPSPs. *Science* 275:213–215.
- Marsicano G, Wotjak CT, Azad SC, Bisogno T, Rammes G, Cascioli MG, Hermann H, Tang J, Hofmann C, Zieglgänsberger W, Di Marzo V, Lutz B (2002) The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature* 418:530–534.
- Martin-Fernandez M, Jamison S, Robin LM, Zhao Z, Martin ED, Aguilar J, Benneyworth MA, Marsicano G, Araque A (2017) Synapse-specific astrocyte gating of amygdala-related behavior. *Nature Neuroscience* 20:1540–1548.
- Martín ED, Fernández M, Perea G, Pascual O, Haydon PG, Araque A, Ceña V (2007) Adenosine released by astrocytes contributes to hypoxia-induced modulation of synaptic transmission. *GLIA* 55:36–45.
- Milad MRR, Quirk GJJ (2002) Neurons in medial prefrontal cortex signal memory for fear extinction. *Nature* 420:70–74.
- Min R, Nevian T (2012) Astrocyte signaling controls spike timing-dependent depression at neocortical synapses. *Nature Neuroscience* 15:746–753.
- Mockett B, Coussens C, Abraham WC (2002) NMDA receptor-mediated metaplasticity during the induction of long-term depression by low-frequency stimulation. *European Journal of Neuroscience* 15:1819–1826.
- Molina DP, Ariwodola OJ, Linville C, Sonntag WE, Weiner JL, Brunso-Bechtold JK, Adams MM (2012) Growth hormone modulates hippocampal excitatory synaptic transmission and plasticity in old rats. *Neurobiology of Aging* 33:1938–1949.
- Moloney AM, Griffin RJ, Timmons S, O'Connor R, Ravid R, O'Neill C (2010) Defects in IGF-1 receptor, insulin receptor and IRS-1/2 in Alzheimer's disease indicate

- possible resistance to IGF-1 and insulin signalling. *Neurobiology of Aging* 31:224–243.
- Morgan MA, Schulkin J, Ledoux JE (2003) Ventral medial prefrontal cortex and emotional perseveration: The memory for prior extinction training. *Behavioural Brain Research* 146:121–130.
- Mysoet J, Dupont E, Bastide B, Canu MH (2015) Role of IGF-1 in cortical plasticity and functional deficit induced by sensorimotor restriction. *Behavioural Brain Research* 290:117–123.
- Navarrete M, Araque A (2008) Endocannabinoids Mediate Neuron-Astrocyte Communication. *Neuron* 57:883–893.
- Navarrete M, Araque A (2010) Endocannabinoids potentiate synaptic transmission through stimulation of astrocytes. *Neuron* 68:113–126.
- Navarrete M, Perea G, de Sevilla DF, Gómez-Gonzalo M, Núñez A, Martín ED, Araque A (2012) Astrocytes mediate in vivo cholinergic-induced synaptic plasticity. *PLoS Biology* 10:e1001259.
- Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA (2003) New roles for astrocytes: Redefining the functional architecture of the brain. *Trends in Neurosciences* 26:523–530.
- Nishijima T, Piriz J, Duflot S, Fernandez AM, Gaitan G, Gomez-Pinedo U, Verdugo JMG, Leroy F, Soya H, Nuñez A, Torres-Aleman I (2010) Neuronal Activity Drives Localized Blood-Brain-Barrier Transport of Serum Insulin-like Growth Factor-I into the CNS. *Neuron* 67:834–846.
- Núñez A, Carro E, Torres-Alemán I (2003) Insulin-like growth factor I modifies electrophysiological properties of rat brain stem neurons. *Journal of neurophysiology* 89:3008–3017.
- Nussinovitch I, Rahamimoff R (1988) Ionic basis of tetanic and post-tetanic potentiation at a mammalian neuromuscular junction. *The Journal of Physiology* 396:435–455.

- Ogundele OM, Ebenezer PJ, Lee CC, Francis J (2017) Stress-altered synaptic plasticity and DAMP signaling in the hippocampus-PFC axis; elucidating the significance of IGF-1/IGF-1R/CaMKII α expression in neural changes associated with a prolonged exposure therapy. *Neuroscience* 353:147–165.
- Pamplona FA, Prediger RDS, Pandolfo P, Takahashi RN (2006) The cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 facilitates the extinction of contextual fear memory and spatial memory in rats. *Psychopharmacology* 188:641–649.
- Panatier A, Vallée J, Haber M, Murai KK, Lacaille JC, Robitaille R (2011) Astrocytes are endogenous regulators of basal transmission at central synapses. *Cell* 146:785–798.
- Parpura V, Zorec R (2010) Gliotransmission: Exocytotic release from astrocytes. *Brain Research Reviews* 63:83–92.
- Pascual O, Casper K, Kubera C, Zhang J, Revilla-Sanchez R, Sul J, Takano H, Moss S, McCarthy K, Haydon P (2005) Astrocytic Purinergic Signaling Coordinates Synaptic Networks. *Science* 310:113–116.
- Pavlov IP (2010a) Conditioned reflexes: An investigation of the physiological activity of the cerebral cortex. *Annals of neurosciences* 17.
- Pavlov IP (2010b) Conditioned reflexes: An investigation of the physiological activity of the cerebral cortex. *Annals of neurosciences* 17.
- Paxinos G, Franklin K (2008) *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, Compact | 978-0-12-374244-5 | Elsevier.
- Paxinos G, Watson C (2004) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates - The New Coronal Set*.
- Perea G, Araque A (2007) Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science* 317:1083–1086.
- Perea G, Gómez R, Mederos S, Covelo A, Ballesteros JJ, Schlosser L, Hernández-Vivanco A, Martín-Fernández M, Quintana R, Rayan A, Díez A, Fuenzalida M, Agarwal A,

- Bergles DE, Bettler B, Manahan-Vaughan D, Martín ED, Kirchhoff F, Araque A (2016) Activity-dependent switch of gabaergic inhibition into glutamatergic excitation in astrocyte-neuron networks. *eLife*.
- Perea G, Navarrete M, Araque A (2009) Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends in Neurosciences* 32:421–431.
- Perez-Alvarez A, Navarrete M, Covelo A, Martin ED, Araque A (2014) Structural and Functional Plasticity of Astrocyte Processes and Dendritic Spine Interactions. *Journal of Neuroscience* 34:12738–12744.
- Peruzzi F, Prisco M, Dews M, Salomoni P, Grassilli E, Romano G, Calabretta B, Baserga R (1999) Multiple Signaling Pathways of the Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor in Protection from Apoptosis. *Mol Cell Biol* 19:7203–7215.
- Pierret T, Lavallée P, Deschênes M (2000) Parallel Streams for the Relay of Vibrissal Information through Thalamic Barreloids. *The Journal of Neuroscience* 44:835–844.
- Pintor A, Pezzola A, Reggio R, Quarta D, Popoli P (2000) The mGlu5receptor agonist CHPG stimulates striatal glutamate release: Possible involvement of A(2A) receptors. *NeuroReport* 11:3611–3614.
- Pouchelon G, Frangeul L, Rijli FM, Jabaudon D (2012) Patterning of pre-thalamic somatosensory pathways. *European Journal of Neuroscience* 35:1533–1539.
- Quirk GJ, Armony JL, Ledoux JE (1997) Components of Tone-Evoked Spike Trains in Auditory Cortex and Lateral Amygdala. *Cell* 19:613–624.
- Quirk GJ, Repa JC, LeDoux JE (1995) Fear conditioning enhances short-latency auditory responses of lateral amygdala neurons: Parallel recordings in the freely behaving rat. *Neuron* 15:1029–1039.
- Quirk GJ, Russo GK, Barron JL, Lebron K (2000) The role of ventromedial prefrontal cortex in the recovery of extinguished fear. *Journal of Neuroscience* 20:6225–6231.

- Ramsey MM (2005) Functional Characterization of Des-IGF-1 Action at Excitatory Synapses in the CA1 Region of Rat Hippocampus. *J Neurophysiol* 94:247–254.
- Repa JC, Muller J, Apergis J, Desrochers TM, Zhou Y, LeDoux JE (2001) Two different lateral amygdala cell populations contribute to the initiation and storage of memory. *Nature Neuroscience* 4:724–731.
- Rinderknecht E, Humbel RE (1978) The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *Journal of Biological Chemistry* 253:2769–76.
- Rodrigues RJ, Alfaro TM, Rebola N, Oliveira CR, Cunha RA (2005) Co-localization and functional interaction between adenosine A2A and metabotropic group 5 receptors in glutamatergic nerve terminals of the rat striatum. *Journal of Neurochemistry* 92:433–441.
- Royer S, Martina M, Paré D (1999) An inhibitory interface gates impulse traffic between the input and output stations of the amygdala. *Journal of Neuroscience* 19:10575–10583.
- Sah P, Bekkers JM (1996) Apical dendritic location of slow afterhyperpolarization current in hippocampal pyramidal neurons: implications for the integration of long-term potentiation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16:4537–4542.
- Santini E, Porter JT (2010) M-Type Potassium Channels Modulate the Intrinsic Excitability of Infralimbic Neurons and Regulate Fear Expression and Extinction. *Journal of Neuroscience* 30:12379–12386.
- Santini E, Quirk GJ, Porter JT (2008) Fear Conditioning and Extinction Differentially Modify the Intrinsic Excitability of Infralimbic Neurons. *Journal of Neuroscience* 28:4028–4036.
- Santini E, Sepulveda-Orengo M, Porter JT (2012) Muscarinic receptors modulate the intrinsic excitability of infralimbic neurons and consolidation of fear extinction. *Neuropsychopharmacology* 37:2047–2056.

- Schipke CG, Haas B, Kettenmann H (2008) Astrocytes discriminate and selectively respond to the activity of a subpopulation of neurons within the barrel cortex. *Cerebral Cortex* 18:2450–2459.
- Sepulveda-Orengo MT, Lopez A V., Soler-Cedeno O, Porter JT (2013) Fear Extinction Induces mGluR5-Mediated Synaptic and Intrinsic Plasticity in Infralimbic Neurons. *Journal of Neuroscience* 33:7184–7193.
- Seto D, Zheng WH, McNicoll A, Collier B, Quirion R, Kar S (2002) Insulin-like growth factor-I inhibits endogenous acetylcholine release from the rat hippocampal formation: Possible involvement of GABA in mediating the effects. *Neuroscience* 115:603-12.
- Shigetomi E, Bowser DN, Sofroniew M V., Khakh BS (2008) Two Forms of Astrocyte Calcium Excitability Have Distinct Effects on NMDA Receptor-Mediated Slow Inward Currents in Pyramidal Neurons. *Journal of Neuroscience* 28:6659–6663.
- Shinar Y, McMorris FA (1995) Developing oligodendroglia express mRNA for insulin-like growth factor-I, a regulator of oligodendrocyte development. *Journal of Neuroscience Research* 42:516–527.
- Sierra-Mercado D, Padilla-Coreano N, Quirk GJ (2011) Dissociable roles of prelimbic and infralimbic cortices, ventral hippocampus, and basolateral amygdala in the expression and extinction of conditioned fear. *Neuropsychopharmacology* 36:529–538.
- Sonntag WE, Bennett SA, Khan AS, Thornton PL, Xu X, Ingram RL, Brunso-Bechtold JK (2000) Age and insulin-like growth factor-1 modulate N-methyl-D-aspartate receptor subtype expression in rats. *Brain Research Bulletin* 51:331–338.
- Sotres-Bayon F, Bush DEA, LeDoux JE (2007) Acquisition of fear extinction requires activation of NR2B-containing NMDA receptors in the lateral amygdala. *Neuropsychopharmacology* 32:1929–1940.
- Spruston N (2008) Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration. *Nature Reviews Neuroscience* 9:206–221.

- Swanson LW (1981) A direct projection from Ammon's horn to prefrontal cortex in the rat. *Brain Research* 217:150–154.
- Szinyei C, Heinbockel T, Montagne J, Pape H-C (2000) Putative Cortical and Thalamic Inputs Elicit Convergent Excitation in a Population of GABAergic Interneurons of the Lateral Amygdala. *J Neurosci* 20:8909–8915.
- Takata N, Mishima T, Hisatsune C, Nagai T, Ebisui E, Mikoshiba K, Hirase H (2011) Astrocyte Calcium Signaling Transforms Cholinergic Modulation to Cortical Plasticity In Vivo. *Journal of Neuroscience* 31:18155–18165.
- Theodosis DT, Poulain DA, Oliet SHR (2008) Activity-Dependent Structural and Functional Plasticity of Astrocyte-Neuron Interactions. *Physiological Reviews* 88:983–1008.
- Thierry AM, Gioanni Y, Dégénétais E, Glowinski J (2000) Hippocampo-prefrontal cortex pathway: Anatomical and electrophysiological characteristics. *Hippocampus* 10:411–419.
- Torres-Aleman I, Pons S, Santos-Benito FF (1992) Survival of Purkinje Cells in Cerebellar Cultures is Increased by Insulin-like Growth Factor I. *European Journal of Neuroscience* 4:864–869.
- Trueba-Sáiz A, Cavada C, Fernandez AM, Leon T, González DA, Fortea Ormaechea J, Lleó A, Del Ser T, Nuñez A, Torres-Aleman I (2013) Loss of serum IGF-I input to the brain as an early biomarker of disease onset in Alzheimer mice. *Translational Psychiatry* 3:e330.
- Turrigiano GG (2008) The Self-Tuning Neuron: Synaptic Scaling of Excitatory Synapses. *Cell* 135:422–435.
- Urbain N, Deschenes M (2007) A New Thalamic Pathway of Vibrissal Information Modulated by the Motor Cortex. *Journal of Neuroscience* 27:12407–12412.
- Valentinis B, Baserga R (2001) IGF-I receptor signalling in transformation and differentiation. *Journal of Clinical Pathology - Molecular Pathology* 54:133–137.

- Vernadakis A (1996) Glia-neuron intercommunications and synaptic plasticity. *Progress in Neurobiology* 49:185–214.
- Vertes RP (2004) Differential Projections of the Infralimbic and Prelimbic Cortex in the Rat. *Synapse* 51:32–58.
- Volterra A, Meldolesi J (2005) Astrocytes, from brain glue to communication elements: The revolution continues. *Nature Reviews Neuroscience* 6:626–640.
- Walz W (1989) Role of glial cells in the regulation of the brain ion microenvironment. *Progress in Neurobiology* 33:309–333.
- Wang X, Lou N, Xu Q, Tian GF, Peng WG, Han X, Kang J, Takano T, Nedergaard M (2006) Astrocytic Ca^{2+} -signaling evoked by sensory stimulation in vivo. *Nature Neuroscience* 9:816–823.
- Watt AJ, Van Rossum MCW, MacLeod KM, Nelson SB, Turrigiano GG (2000) Activity coregulates quantal AMPA and NMDA currents at neocortical synapses. *Neuron* 26:659–670.
- Woo NH, Nguyen PV (2002) “Silent” Metaplasticity of the Late Phase of Long-Term Potentiation Requires Protein Phosphatases. *Learning & Memory* 9:202–213.
- Wu WW (2004) Slow Afterhyperpolarization Governs the Development of NMDA Receptor-Dependent Afterdepolarization in CA1 Pyramidal Neurons During Synaptic Stimulation. *Journal of Neurophysiology* 92:2346–2356.
- Zackenfels K, Oppenheim RW, Rohrer H (1995) Evidence for an important role of IGF-I and IGF-II for the early development of chick sympathetic neurons. *Neuron* 14:731–741.
- Zelikowsky M, Bissiere S, Fanselow MS (2012) Contextual Fear Memories Formed in the Absence of the Dorsal Hippocampus Decay Across Time. *Journal of Neuroscience* 32:3393–3397.
- Zhang JM, Wang HK, Ye CQ, Ge W, Chen Y, Jiang ZL, Wu CP, Poo MM, Duan S (2003) ATP Released by Astrocytes Mediates Glutamatergic Activity-Dependent

Heterosynaptic Suppression. *Neuron* 40:971–982.

Zucker RS, Regehr WG (2002) SHORT-TERM SYNAPTIC PLASTICITY - Annual Review of Physiology, 64(1):355. Annual review of physiology 64:355–405.